

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

13 April 2000 (13.04.00)

International application No.:

PCT/JP99/05456

Applicant's or agent's file reference:

2554WO0P

International filing date:

04 October 1999 (04.10.99)

Priority date:

05 October 1998 (05.10.98)

Applicant:

NISHIMURA, Osamu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

26 October 1999 (26.10.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05456

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 1/12, C12N 15/09, C12P 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.), 17 December, 1997 (17.12.97) & JP, 10-072489, A & KR, 98002062, A & CA, 2207723, A & DE, 69700561, E	1-16
A	EP, 193515, A1 (MONSANTO CO.), 03 September, 1986 (03.09.86) & PT, 82070, A & AU, 8942825, A & NO, 300551, B1 & JP, 2863113, B2 & ZA, 8601323, A & DK, 8600808, A & CN, 1051302, A & ES, 8801851, A & US, 5744328, A & IE, 80663, B & RU, 2094439, C1 & CA, 1338981, C & BR, 1100005, A3 & IL, 112402, A & JP, 7309890, A & HU, 210671, B & RO, 106956, B1 & KR, 9200849, B1 & SU, 1646489, A	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2000 (17.01.00)Date of mailing of the international search report  
25 January, 2000 (25.01.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05456

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 86/01229, A (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.), 27 February, 1986 (27.02.86) & ZA, 8506194, A & AU, 8547739, A & EP, 191827, B1 & JP, 96022240, B2 & IL, 76107, A & DE, 3586773, G & CA, 1318869, C	1-16

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 2554WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05456	国際出願日 (日.月.年) 04. 10. 99	優先日 (日.月.年) 05. 10. 98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>1</sup> C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 26. 10. 99	国際予備審査報告を作成した日 11. 07. 00		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  六笠 紀子	4 B	9 7 3 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-16

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-16

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-16

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: EP, 812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.) 17.12月.1997 (17.12.97)  
& JP, 10-72489, A & KR, 98002062, A & CA, 2207723, A & DE, 69700561, E

## 請求の範囲1~16について

引用文献1には、N末端メチオニンの除去方法として、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩と $\alpha$ -ジケトン類を反応させた後、加水分解することが記載されている。

また、 $\alpha$ -ジケトン類を反応させる際は銅イオンなどの遷移金属イオンおよびピリジンなどの塩基の存在下にグリオキシル酸等の $\alpha$ -ジケトン類またはその塩を反応させること、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドは遺伝子工学的に製造されたペプチドであってもいいこと、加水分解反応に用いる塩基として、3,4-ジアミノ安息香酸などのジアミン類が挙げられ、反応には緩衝液を溶媒として用いることが好ましいことが記載され、緩衝液としては酢酸緩衝液などが挙げられている。

ここで、緩衝液として公知のものから加水分解反応を阻害しない適当なものを選択することは当業者が通常なし得たものと認められ、請求の範囲1に記載された緩衝液を選択したことで他の緩衝液に比べて格別顕著な効果(反応性が高い等)を奏するものとは認められない。

従って、請求の範囲1に係る発明は引用文献1の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

また、ペプチドの種類を選択すること、緩衝液の濃度を決定することは当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲2乃至16に係る発明は引用文献1の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENT COOPERATION TREATY  
**PCT**  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT  
(PTC Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>2554WO0P</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/JP99/05456</b>	International filing date (day/month/year) <b>04/10/1999</b>	Priority date (day/month/year) <b>05/10/1998</b>	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02</b>			
Applicant <b>TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD</b>			

1.	This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of    sheets.	
3.	This report contains indications relating to the following items: <div style="margin-left: 20px;">           I    <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report            II    <input type="checkbox"/> Priority            III    <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability            IV    <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention            V    <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement            VI    <input type="checkbox"/> Certain documents cited            VII    <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application            VIII    <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application         </div>

Date of submission of the demand  <b>26/10/1999</b>	Date of completion of this report  <b>11/07/2000</b>
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer  <b>MUKASA Noriko</b>  Telephon No. 03 3581 1101                      3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP99/05456

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):

☒ International Filing Document as originally filed

**Description, pages:**

☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Claims, No:**

☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Drawings No:**

☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Sequence Listing**

☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP99/05456

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Inventive Step (IS)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations  
see separate sheet**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

International application N . PCT/JP99/05456

Re Item V

1. Reference is made to the following documents:

D1: EP812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.) 17. December. 1997(17.12.97) & JP, 10-72489, A&KR, 98002062, A & CA, 2207723, A6 DE, 69700561, E

Claim 1-16

Reference 1: EP, 812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.) 17 Dec. 1997  
(17. 12. 97) & JP, 10-072489, A & KR, 98002062, A & CA,  
2207723, A & DE, 69700561, E

As to Claims 1 to 16

In Reference 1, with regard to a method for removing N-terminal methionine, the fact that following the reaction between peptides or the salts thereof possessing optionally oxidized N-terminal methionine and  $\alpha$ -diketones, hydrolysis is performed is described.

Further, the follows are described. In the case of the reaction with  $\alpha$ -diketones, in the presence of transition metal ion such as copper ion and base such as pyridine,  $\alpha$ -diketones such as glyoxylic acid or salts thereof may be reacted. Peptides possessing optionally oxidized N-terminal methionine may be genetic engineered peptides. Base used in hydrolysis may, for example, be diamine such as 3,4-diaminobenzoic acid. In the reaction, to use buffer solutions as a solvent is preferred. The buffer solutions such as acetate buffer are mentioned.

At this point, it is accepted that the persons skilled in the art can be easily selected appropriate buffer solutions that do not inhibit hydrolysis from publicly known buffer solutions. Moreover, it is not accepted that by selecting the buffer solution described in Claim 1, compared with other buffer solutions, particularly obvious meritorious effects such as high activity occur.

Therefore, it is accepted that the persons skilled in the art can be easily made the invention related to Claim 1 based on the description of the Reference 1.

Further, It is accepted that as occasion demands, the person skilled in the art can be selected sorts of peptides and decided concentration of the buffer solutions.

Therefore, it is accepted that the persons skilled in the art can be easily made the invention related to Claim 2 to 16 based on the description of the Reference 1.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2554WO0P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05456	International filing date (day/month/year) 04 October 1999 (04.10.99)	Priority date (day/month/year) 05 October 1998 (05.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 26 October 1999 (26.10.99)	Date of completion of this report 11 July 2000 (11.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05456

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP99/05456

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Cited document 1: EP, 812856, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 17 December, 1997 (17.12.97); & JP, 10-72489, A & KR, 98002062, A & CA, 2207723, A & DE, 69700561, E

#### Concerning claims 1-16

Cited document 1 discloses a method for eliminating N-terminal methionine that involves reacting a peptide having an optionally oxidized methionine residue at its N-terminal or a salt thereof with an  $\alpha$ -diketone and then carrying out hydrolysis.

Moreover, said document also 1) discloses the fact that the reaction is carried out with an  $\alpha$ -diketone such as glyoxylic acid or a salt thereof under the presence of transition metal ions such as copper ions and a base such as pyridine, 2) discloses the fact that the peptide having an optionally oxidized methionine residue at its N-terminal may be a peptide manufactured using genetic engineering techniques, 3) proposes a diamine such as 3,4-diaminobenzoic acid as the base used in the hydrolysis reaction, 4) discloses the fact that it is desirable to use a buffer solution as the solvent in the reaction, and 5) proposes things like an acetic acid buffer solution as the buffer solution.

Here, it is considered that a person skilled in the art would have been able to select a suitable buffer solution that does not impede the hydrolysis reaction from amongst publicly known buffer solutions. It is considered that selecting the buffer solution disclosed in claim 1 as opposed to a different buffer solution does not result in any particularly remarkable effects (for example an increase in reactivity).

It is thus considered that the subject matter of claim 1 could easily have been arrived at by a person skilled in the art based on the disclosures in cited document 1.

Moreover, it is considered that selecting the type of peptide and determining the concentration of the buffer solution are things that a person skilled in the art could have accomplished as required.

It is thus considered that subject matter of claims 2-16 could easily have been arrived at by a person skilled in the art based on the disclosures in cited document 1.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/20439</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05456</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月4日(04.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/282476 ✓ 1998年10月5日(05.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 西村 紀(NISHIMURA, Osamu)(JP/JP) 〒305-0812 茨城県つくば市大字東平塚586番地2 Ibaraki, (JP) 浅野常夫(ASANO, Tsuneo)(JP/JP) 〒666-0111 兵庫県川西市大和東3丁目7番地の5 Hyogo, (JP) 末永正人(SUENAGA, Masato)(JP/JP) 〒663-8105 兵庫県西宮市中島町11-15-302 Hyogo, (JP) 大前弘明(OHMAE, Hiroaki)(JP/JP) 〒639-0212 奈良県北葛城郡上牧町服部台2丁目5番2号 Nara, (JP)</p>		<p>奥谷範雄(OKUTANI, Norio)(JP/JP) 〒565-0862 大阪府吹田市津雲台5丁目18番D-75-106号 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHINA, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROCESS FOR ELIMINATING N-TERMINAL METHIONINE</p> <p>(54)発明の名称 N末端メチオニンの除去方法</p> <p>(57) Abstract A process for freeing a peptide having an optionally oxidized diketomethionine residue at the N-terminal or a salt thereof from the diketomethionine residue, characterized by reacting the peptide or salt with 3,4-diaminobenzoic acid or a salt thereof in the presence of acetic acid and sodium formate, formic acid and sodium formate, or formic acid and sodium acetate; and a process for preparing peptides free from N-terminal methionine residues or salts thereof.</p>		

N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基のジケトン体の除去方法、およびN末端にメチオニン残基を有していないペプチドまたはその塩の製造法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボズニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CC	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## N末端メチオニンの除去方法

## 5 技術分野

本発明は、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を有するペプチド（蛋白質を含む）またはその塩から酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下、効率よくN末端の酸化されていてもよいメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を除去する方法；およびN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を有していないペプチドまたはその塩の製造法等に関する。

## 背景技術

15 蛋白質が細胞内で生合成される際には、そのN末端は mRNAの開始コドンAUGに対応するメチオニンから始まっていることが知られている。しかしながらこのメチオニンは以後のプロセッシングによって取り除かれてしまうため、完成された成熟蛋白質分子にはもはや存在しないのが通例である。

20 遺伝子組換え技術の進歩により、有用な蛋白質を微生物や動物細胞、例えば大腸菌を用いて産生することが可能となったが、本手法により産生される蛋白質には、上記メチオニンが残存している例が見い出されている。例えば、大腸菌で発現させたヒト成長ホルモンにおいてメチオニンの付加率はほぼ100% [ネイチャー (Nature), 293, 408 (1981)] に達し、インターフェロン- $\alpha$ においては50% [ジャーナル・オブ・インターフェロン・リサーチ (J. Interferon Res.), 1, 381 (1981)]、非グリコシル化ヒトインターロイキン-2では、天然型ヒトインターロイキン-2と同じくアラニンではじまる分子種 (r IL-2) に加え、アミノ末端にさらにメチオニンの付加した (N末端にメチオニン残基を有する) 分子種 (Met-r IL-2) の存在が認められている。

一方、N末端のアミノ酸を化学的に除去する方法としては、Dixon が、1964年に、DL-アラニルグリシンにグリオキシル酸、ピリジン、酢酸銅を反応させるとアミノ基移転反応が起こり、ピルボイルグリシンが生成すること [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 92, 661 (1964)]、さらに、化合物にチオセミカルバジドを反応させるとアミド結合の解裂が起こり、グリシンを生成することを報告している [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 90, 2C (1964)]。次いで、この反応をチトクローム c-551 (Pseudomonas cytochrome c-551) に応用し、N末端グルタミン酸が除去されることを報告している [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 94, 463 (1965)]。

同じ蛋白質であっても、N末端にメチオニンの付加した分子種とそうでない分子種とは蛋白質の高次構造、生物活性、安定性が相互に異なる可能性があり、さらにメチオニンのN末端への付加が抗原性の増加をもたらす可能性もありうるものと考えられる。従って、産業利用上の観点から、この開始コドンに対応するN末端メチオニン除去法を確立することは意義あることと考えられる。

この課題を解決するため、臭化シアン (BrCN) 分解によってメチオニンを取り除く方法が提案 [サイエンス (Science), 198, 1056 (1977)] されているが、この場合は所望の成熟蛋白質中にメチオニン残基が存在しないことが前提となる上、過酷な化学反応を蛋白質に付す該方法によっては、決して満足する結果は得られない。

N末端にメチオニン残基を有するペプチドまたは蛋白質から、ペプチドまたは蛋白質の種類に拘わらず、選択的かつ効率的に、N末端のメチオニン残基を除去することを可能とする化学的な方法としては、特開平10-72489号 (EP-A-812856号) に記載の方法以外には全く知られていないが、このことは、最終生産物となるペプチドまたは蛋白質を変性させることなく、マイルドな条件下でN末端のメチオニン残基を除去しうる化学的な反応を見い出すことの困難性に起因すると考えられる。特に、分子量が比較的大きく、遺伝子工学的に製造される蛋白質、なかでも、医薬として用い

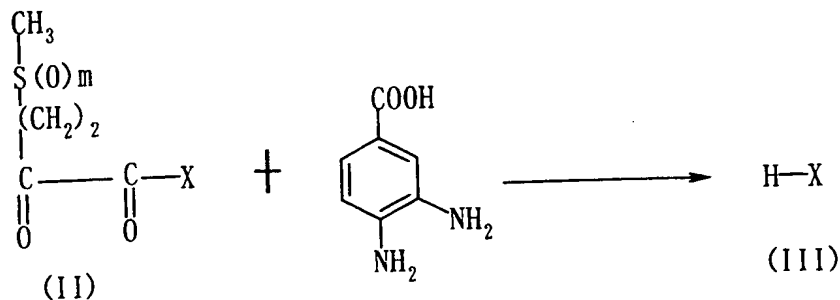
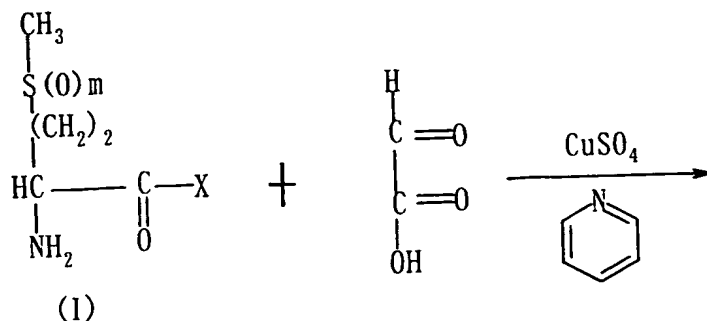
ることを目的とした蛋白質から、N末端に余分に付加したメチオニンを除去する場合、メチオニン除去後に蛋白質の活性が低下しないことが要求されるため、通常、弱酸性から弱アルカリの水溶液中で加熱することなく、反応を進行させる必要があり、化学的な反応条件としては制限が多いので、良好な  
5 反応条件を見い出せないのが現状であった。

#### 発明の開示

本発明者らは、遺伝子工学的に製造されるペプチド（蛋白質を含む）におけるN末端のメチオニン残基のみを切断することによる、天然型のアミノ酸  
10 配列を有するペプチドの製造法を提供すべく鋭意研究したところ、下記のスキーム1に表されるとおり式（I）で表わされるN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドに、例えば、 $\alpha$ -ジケトン類であるグリ  
オキシル酸、遷移金属イオンを供与しうる硫酸銅、塩基（例えばアミン類）  
であるピリジンを反応させて、アミノ基移転反応を行うことにより得られる  
15 該メチオニン残基のジケトン体を有するペプチドに塩基（例えばジアミン類）  
である3, 4-ジアミノ安息香酸と、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸および  
ギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム等の存在下に反応させて  
加水分解反応を行うことにより、該メチオニン残基のジケトン体を有するペ  
プチドからメチオニン残基のジケトン体を予想外にも効率よく除去できるこ  
20 とを見出した。すなわち、本発明者らはメチオニン残基を有するペプチドか  
ら、N末端の酸化されていてもよいメチオニン残基を除去し、その活性を低  
下させることなく、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有して  
いないペプチドを予想外にも高収率で得る方法を見出し、さらに研究を進  
め、本発明を完成させるに至った。

25

（スキーム1）

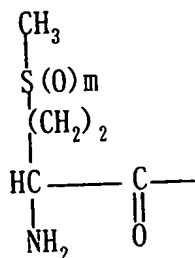


- 5 [式 (I) 中、mは0ないし2の整数を示し、Xはアミノ酸残基または2以上の任意のアミノ酸数を有するペプチド鎖であればいずれでもよいが、実用的な面からは、遺伝子工学的に製造された蛋白質のXに対応する部分のペプチド鎖が挙げられる。なお、本願明細書において、蛋白質あるいはペプチドと称する場合、複数のアミノ酸からなるペプチドまたは蛋白質は、非グリコシル化またはグリコシル化ペプチドまたは蛋白質のいずれであってもよい。]

本願明細書においては、上記スキーム1中、

- 10 一般式 (I) に代表される化合物を「N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチド」または「メチオニン残基を有するペプチド」；

一般式 (I) において



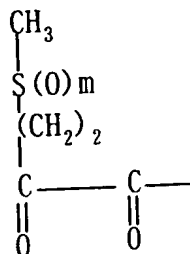
[式中、mは前記と同意義]

- 15 に代表される部分構造を「酸化されていてもよいメチオニン残基」、「メチオニン残基」または「メチオニン」；

一般式 (I I) に代表される化合物を「N末端に酸化されていてもよいメ

チオニン残基のジケトン体を有するペプチド」または「メチオニン残基のジケトン体を有するペプチド」；

一般式 (I I) において



5 [式中、mは前記と同意義]

に代表される部分構造を「酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体」または「メチオニン残基のジケトン体」；および、

一般式 (I I I) に代表される化合物を「N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有していないペプチド」または「N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有していないペプチド」  
 10 と、それぞれ称することがある。

すなわち、本発明は、

(1) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基のジケトン  
 15 体の除去方法、

(2) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩が、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を  $\alpha$ -ジケトン類と反応させることにより得られるペプチドまたはその塩である前記 (1) 記載の方法、  
 20

(3) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドが遺伝子工学的に製造されたペプチドである前記 (2) 記載の方法、

(4) ペプチドが (i) 成長ホルモン、(ii) ベータセルリン、(iii) インターロイキン-2、(iv) ニュートロフィン-3 または (v) アペリンである前記 (1)  
 25 記載の方法、

(5) ペプチドが成長ホルモンである前記(1)記載の方法、

(6) 酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムが、pH約2ないし9で約0.1ないし8mol/Lの緩衝液として用いられることを特徴とする前記(1)記載の方法、

5 (7) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基のジケトン体の除去方法、

10 (8) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有していないペプチドまたはその塩の製造法、

15 (9) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩が、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を $\alpha$ -ジケトン類と反応させることにより得られるペプチドまたはその塩である前記(8)記載の製造法、

20 (10) 酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムが、pH約2ないし9で約0.1ないし8mol/Lの緩衝液として用いられることを特徴とする前記(8)記載の製造法、

(11) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端にメチオニン残基を有していないペプチドまたはその塩の製造法、

25 (12) 遺伝子工学的に製造され、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するヒト成長ホルモンまたはその塩をグリオキシル酸またはその塩と硫酸銅およびピリジンの存在下に反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN



末端にメチオニン残基を有していないヒト成長ホルモンまたはその塩の製造法、

(13) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩の該メチオニン残基を除去するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムと(ii) 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用、

(14) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩の該メチオニン残基のジケトン体を除去するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii) 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用、

(15) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩から、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有しないペプチドまたはその塩を製造するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii) 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用、および、

(16) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩から、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有していないペプチドまたはその塩を製造するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii) 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用、に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例4a)で得られた電気泳動の結果を示す。レーン(Lane) 1は分子量マーカーを、レーン(Lane) 2は精製hGHを示す。

図2は、実施例16a)で得られた電気泳動の結果を示す。レーン(Lane) 1は分子量マーカーを、レーン(Lane) 2は実施例15で得られたBTCを示す。

図3は、実施例18a)で得られた電気泳動の結果を示す。レーン(Lane)

e) 1 は分子量マーカーを、レーン (Lane) 2 は実施例 17 で得られた IL-2 を示す。

図 4 は、実施例 26 で用いられた DNA フラグメントを示す。

図 5 は、実施例 26 で得られた 2 重鎖構成のヒトアペリン-36 を製造する模式図を示す。

図 6 は、実施例 27 で得られたプラスミド pTB960-13 の構築図を示す。

発明を実施するための最良の形態

10 本明細書において、酸化されていてもよいメチオニン残基は、メチオニン残基またはその S 酸化体を示し、メチオニン残基の S 酸化体としては、スルホキシドおよびスルホン体が挙げられる。

N 末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドとしては、式  $\text{CH}_3\text{-S(O)}_m\text{-(CH}_2)_2\text{-CH(NH}_2\text{)-CO-X}$  [式中、m は 0 ないし 2 の整数を示し、X はアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す。] で表されるペプチドが挙げられ、これらは塩を形成してもよく、塩としては、本発明の反応を阻害しないものであれば何れでもよいが、中でも薬学的に許容可能な塩が好ましく、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸など無機酸との塩、酢酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

20 N 末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドは、遺伝子工学的に製造された N 末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドであることが好ましい。

上記式中、m としては 0 が好ましい。また、X としてはアミノ酸の数が 2 以上のペプチド鎖が好ましい。

本発明のペプチドとしては、アミノ酸数が 50 未満のいわゆるペプチドあるいはアミノ酸数が 50 以上のいわゆる蛋白質の何れであってもよい。

このように、本願明細書において、「ペプチド」で示される用語は、アミノ酸数が50未満の分子のみならず、アミノ酸数が50以上の分子をも含むものであるが、なかでも、アミノ酸数が50以上の分子（いわゆる蛋白質）が好ましく用いられる。

- 5        好ましいペプチドとしては、アミノ酸数が2ないし1000であるペプチド、さらに好ましくはアミノ酸数が15ないし500であるペプチドが挙げられ、その具体例としては、成長ホルモン（GH）類〔例えば、ヒト成長ホルモン（hGH）（例、20K-hGH、22K-hGHなど）など〕、ベータセルリン（BTC）、副甲状腺ホルモン（PTH）、インシュリン、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、ニューロトロフィン-3、4または6、中枢神経成長因子、グリア成長因子、肺由来神経栄養因子、上皮細胞成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子 $\alpha$ または $\beta$ 、血管内皮細胞成長因子、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベータ、ウロキナーゼ、
- 10        プロテインC、トロンボモジュリン、骨形成因子、カルシトニン、インスリン様成長因子、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ 、インターロイキン-1（ $\alpha$ 、 $\beta$ ）~12、顆粒コロニー刺激因子、顆粒マクロファージ・コロニー刺激因子、顆粒マクロファージ刺激因子、トロンボポエチン、エリスロポイエチン、PACAP、心房性ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、
- 15        巨核球成長因子、血液幹細胞成長因子、肝細胞成長因子、モチリン、イムノトキシン、腫瘍壊死因子、ヒルジン、コルチコトロピン、アンジオテンシン、アンジオテンシン2およびそのペプチド性拮抗薬、アンジオテンシン3、ブラジキニン類、ブラジキニン増強因子、 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ エンドルフィン、エンケファリン、好球中走化性因子、ガストリン、グルカゴン、成長ホルモン
- 20        放出因子、キョウトルフィン、カリジン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、肥満細胞脱顆粒ペプチド、メラニン細胞刺激ホルモン、ニューロテンシン、トリプシンインヒビター、オキシトシン、プロインシュリンC-ペプチド、セクレチン、ソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、ユビキチン、ウロガストロン、バソプレッシン類、キニン類、タフトシン、ソマトメ
- 25

ジン、コルチコトロピン放出因子、インスリン様成長因子、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、PTHrP、VIP、DHI、インスリノトロピン、GRP、CCK-PZ、Galanin（ガラニン）、アカトラムペプチド（Antrum Peptide）、PPY、Pancreatic Polypeptide、PSP、パンクレアスタチン、hCG、hCS、リラキシン、血清胸腺因子、サイモポイエチン、サイモシン、

5 ファクターXIII、ファクターVIII、プロウロキナーゼ、SOD、ファクターVIIa、アンチトロンビン、アペリンなどの蛋白質およびそれらのムテイン（天然型の蛋白質に1つ以上のアミノ酸が置換、欠損または付加し、天然の蛋白質と同等またはそれ以上の生物学的または免疫学的活性を示すもの）など、あるいは化学合成などにより製造される公知または新規のペプチドなどが挙げられるが、なかでも、遺伝子工学的に製造されたペプチド（蛋白質を含む）、とりわけ、遺伝子工学的に製造された成長ホルモン類〔例えば、ヒト成長ホルモン（hGH）（例、20K-hGH、22K-hGHなど）など〕、ニューロトロフィン-3、ベータセルリン、副甲状腺ホルモン、インターロイキン-2、アペリンおよびそれらのムテイン、特に成長ホルモン類〔例えば、ヒト成長ホルモン（hGH）（例、20K-hGH、22K-hGHなど）など〕およびそれらのムテイン、とりわけ成長ホルモン類〔例えば、ヒト成長ホルモン（hGH）（例、20K-hGH、22K-hGHなど）など〕が好ましく用いられる。前記アペリンとしては、例えば Biochem.

15 Biophys. Res. Commun., 251, 471-476 (1998)に記載のヒトアペリン-36、ヒトアペリン-13、アペリン-13のN末端のアミノ酸（Gln）がピログルタミン酸化したペプチドなどがあげられ、APJ（O'Dowd. B.F., et al., Gene, 436, 355-359 (1993)）に対し、リガンド活性を有するペプチドであれば、如何なるものであってもよく、具体的には、例えば特願平10-2

20 71654号に記載の「配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に結合能を有するポリペプチド」などが挙げられる。

上記したペプチド（天然型の蛋白質を含む）は、何れの動物種由来のものであってもよいが、実用的には、ヒト由来のペプチド（蛋白質を含む）が好

ましく用いられる。

上記のペプチドは、N末端の酸化されていてもよいメチオニン (Me t) 残基または該メチオニン残基のジケトン体の除去工程に付す前あるいは後にリフォールディング (活性化、再生化) を行うことができる。

- 5      本明細書において、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩とは、式  $\text{CH}_3\text{-S(O)}_m\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-CO-X}$  [式中、 $m$ は0ないし2の整数を示し、 $X$ はアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す。]で表される化合物またはその塩を示す。N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩は、化学
- 10    反応または酵素反応等各種反応により得ることができる。例えば、化学反応により得る方法としては、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を $\alpha$ -ジケトン類と反応させるアミノ基移転反応により、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を得ることができる (特開平10-72489号
- 15    (EP-A-812856号))。

- 本明細書において、 $\alpha$ -ジケトン類は、上記したペプチドまたはその塩のアミノ基移転反応を進行させうるものであれば何れでもよく、例えば式  $\text{R}^1\text{-CO-CO-R}^2$  [式中、 $\text{R}^1$ は水素またはカルボキシル基で置換されていてもよい低級アルキルもしくはフェニル基 (好ましくは水素またはメチル、
- 20    さらに好ましくは水素) を示し、 $\text{R}^2$ は水酸基、低級アルコキシ基または低級アルキルで置換されていてもよいアミノ基 (好ましくは水酸基) を示す。]で表される化合物またはその塩などが挙げられる。

- 上記式中、 $\text{R}^1$ で示される低級アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、 $i$ -プロピル、ブチル、 $i$ -ブチル、 $sec$ -ブチル、 $t$ -ブチルなどの炭素数1ないし6程度のアルキル基などが挙げられ、 $\text{R}^2$ で示される低級アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、 $i$ -プロポキシ、ブトキシ、 $i$ -ブトキシ、 $sec$ -ブトキシ、 $t$ -ブトキシなどの炭素数1ないし6程度のアルコキシ基などが挙げられる。また、 $\text{R}^2$ で示される低級アルキルで置換されていてもよいアミノ基としては、前記した $\text{R}^1$ で
- 25

示される低級アルキル基を1ないし2個有していてもよいアミノ基などが挙げられる。さらに、塩としては、上記したN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドの塩と同様なものが挙げられる。

5  $\alpha$ -ジケトン類の具体例としては、グリオキシル酸、ピルビン酸、オキサ  
ル酢酸、フェニルグリオキシル酸、2-オキソグルタル酸などが挙げられる  
が、なかでも、グリオキシル酸が好ましく用いられる。

$\alpha$ -ジケトン類は塩を形成していてもよく、ナトリウム塩、カリウム塩な  
どのアルカリ金属塩、塩酸塩などの無機酸の塩などがあげられる。

10 N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはそ  
の塩と $\alpha$ -ジケトン類とのアミノ基転移反応は、通常、ペプチドまたはその  
塩1モルに対して、1ないし1万モル（好ましくは2000ないし4000  
モル）程度の $\alpha$ -ジケトン類を、約0ないし70℃（好ましくは約20ない  
し40℃）で約10分ないし5時間（好ましくは約20分ないし2時間）反  
15 応させるのが好ましい。上記したアミノ基転移反応を阻害しないものであれ  
ば何れの緩衝液（例、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液など）を  
用いてもよいが、なかでも、酢酸緩衝液が好ましく用いられる。また、反応  
のpHは、約2ないし9、なかでも、約4ないし7、とりわけ、約5ないし  
6に調整して反応を進行させるのがよい。

20 該アミノ基転移反応を促進するため、遷移金属イオンの存在下に $\alpha$ -ジケ  
トン類を反応させることが好ましく、通常、 $\alpha$ -ジケトン類1モルに対して、  
0.001ないし0.1モル（好ましくは0.01ないし0.05モル）程度の  
遷移金属イオンを用いるのが好ましい。遷移金属イオンとしては、例えば、  
銅イオン（ $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ ）、コバルトイオン（ $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ ）、ニッケルイオ  
ン（ $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{3+}$ ）、鉄イオン（ $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ ）、亜鉛イオン（ $\text{Zn}^{2+}$ ）、ア  
25 ルミニウムイオン（ $\text{Al}^{3+}$ ）、マンガンイオン（ $\text{Mn}^{2+}$ など）、ガリウムイオ  
ン（ $\text{Ga}^{3+}$ ）、インジウムイオン（ $\text{In}^{3+}$ ）、マグネシウムイオン（ $\text{Mg}^{2+}$ ）、  
カルシウムイオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ）などを用いることができるが、なかでも、銅イオ  
ン、コバルトイオンなど、とりわけ、銅イオン（ $\text{Cu}^{2+}$ ）が好ましく用いられ  
る。これらの遷移金属イオンは、通常、硫酸、硝酸、塩酸、過塩素酸などの

無機酸との塩または酢酸、シュウ酸、クエン酸、炭酸などの有機酸との塩として、反応溶媒に添加することができ、なかでも、硫酸銅、酢酸銅、とりわけ、硫酸銅が好ましく用いられる。

5 また、塩基の存在下に $\alpha$ -ジケトン類を反応させることが好ましく、通常、 $\alpha$ -ジケトン類1モルに対して、0.1ないし20モル（好ましくは0.5ないし10モル）程度の塩基を用いるのが好ましい。塩基としては、例えば、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどのアルキルアミン類、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、イミダゾールなどの芳香族アミン類などを用いることができるが、  
10 なかでも、ピリジンが好ましく用いられる。

また、アミノ基転位反応の際に、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩、および該ペプチドまたはその塩のアミノ基転位反応で得られるメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩の沈殿防止などを目的として、該ペプチド、メチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩の種類に応じて、アミノ基転位反応  
15 のための緩衝液中に尿素を添加することが好ましい。例えば、hGHを用いる場合、緩衝液中に尿素を好ましくは約1ないし8M、より好ましくは約3ないし6Mの濃度になるよう添加することが好ましい。

さらに、上記したアミノ基転移反応は、遷移金属イオンおよび塩基の存在  
20 下に $\alpha$ -ジケトン類を反応させることが好ましく、実用的には、遷移金属イオン、塩基および $\alpha$ -ジケトン類の3成分（例えば、硫酸銅、ピリジンおよびグリオキシル酸など）を含有する混合液を、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を含有する水溶液に添加して、アミノ基転移反応を進行させる。

25 該アミノ基転移反応により得られ、式  $\text{CH}_3\text{-S(0)}_m\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-CO-X}$  [式中、mは0ないし2の整数を示し、Xはアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す。]で表される化合物またはその塩（メチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩）は、ペプチドまたは蛋白質の公知精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から

単離・精製することもできるが、そのまま次の加水分解反応に付すこともできる。

5 アミノ基転移反応で得られたメチオニンのジケトン体を有するペプチドまたはその塩は、通常、塩基による加水分解反応に付して、N末端の酸化されていてもよいメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を有していないアミノ酸、ペプチドまたはその塩に変換することができる。

10 加水分解反応に用いる塩基としては、例えば、システアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどのアルキルアミン類またはその塩、N、N-ジメチルアニリン、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、イミダゾールなどの芳香族アミン類またはその塩、o-フェニレンジアミン、トリレン-3,4-ジアミン、3,4-ジアミノ安息香酸およびそのN-アルキル置換体（例えば、N-メチル-1,2-フェニレンジアミン、N-エチル-1,2-フェニレンジアミン、N-イソプロピル-1,2-フェニレンジアミンなど）、2,3-ジアミノフェノール、4-クロロ-o-フェニレンジアミンなどのジアミン類（好ましくは芳香族ジアミン類、なかでも、3,4-ジアミノ安息香酸およびそのN-アルキル置換体（例えば、N-メチル-1,2-フェニレンジアミン、N-エチル-1,2-フェニレンジアミン、N-イソプロピル-1,2-フェニレンジアミンなど）またはそれらの塩など、チオセミカルバジド、アセトンチオセミカルバジド、フェニルチオセミカルバジドなどのチオセミカルバジド類、セレノセミカルバジド、アセトンセレノセミカルバジドなどのセレノセミカルバジド類などのアミン類またはその塩などを用いることができるが、なかでも、アミン類、とりわけ、ジアミン類またはチオセミカルバジド類またはそれらの塩が好ましく用いられ、特に、3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩が好ましく用いられる。

25

加水分解反応に用いられる塩基の塩としては、例えば上記のN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドの塩と同様のものなどがあげられる。

塩基の量は、通常、メチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたは



その塩 1 モルに対して約 1 ないし 1 万モル、好ましくは約 200 ないし 3000 モル、より好ましくは約 500 ないし 3000 モルである。加水分解反応は、通常、約 0 ないし 70℃（好ましくは約 20 ないし 40℃）で約 1 時間ないし 7 日間（好ましくは約 10 時間ないし 5 日間）で進行させるのが好ましい。反応には、緩衝液を溶媒として用いることが好ましく、緩衝液としては、例えば、ギ酸系緩衝液（例えば、酢酸－ギ酸ナトリウム、ギ酸－ギ酸ナトリウム、ギ酸－酢酸ナトリウムなど）などが挙げられる。上記した加水分解反応を阻害しないものであれば何れの緩衝液を用いてもよいが、なかでも、酢酸－ギ酸ナトリウム、ギ酸－ギ酸ナトリウムまたはギ酸－酢酸ナトリウム緩衝液が好ましく用いられる。また、反応の pH は、約 2 ないし 9、なかでも、約 3 ないし 7、とりわけ、約 4 ないし 6 に調整して、反応を進行させるのがよい。これらの緩衝液は、好ましくは約 0.1～8 mol/L、より好ましくは約 0.5～6 mol/L 用いられる。

また、加水分解の際に、N 末端の酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩および加水分解反応により生成する該メチオニン残基を有していないアミノ酸、ペプチドまたはその塩の沈殿防止等を目的として、該メチオニン残基のジケトン体を有するペプチド、該メチオニン残基を有していないアミノ酸、ペプチドまたはその塩の種類に応じて、加水分解反応のための緩衝液中に尿素を添加することが好ましい。例えば、hGH を用いる場合、緩衝液中に尿素を、好ましくは約 1 ないし 6 M、より好ましくは約 2 ないし 5 M の濃度になるよう添加することが好ましい。

このようにして得られるアミノ酸、ペプチドまたはその塩は、公知の精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から単離・精製することもできるが、好ましい例として、例えば、SP-セファロース（ファルマシア バイオテック（株））あるいは、DEAE-5PW（東ソー（株））を介したイオン交換クロマトグラフィーなどによる精製法が挙げられる。

本発明により製造されるペプチドはその N 末端にメチオニンを有さず、また目的とする生理活性ペプチド（例えば、天然の生理活性ポリペプチド）と

同一のアミノ酸配列を有するものとして得られるので、目的とするペプチド（例えば、天然のポリペプチド）と同様の活性を有し低毒性で安全に医薬品や診断用薬剤として使用できる。

5 本発明により、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を有するペプチドからN末端のメチオニン残基あるいは該メチオニン残基のジケトン体を特異的に除去することができる。

本発明の明細書および図面においてアミノ酸等の略号で表示する場合には、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下に示す。  
10 またアミノ酸に関して光学異性がある場合は、特に明示しなければL-体を示す。

	S D S	:	ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	:	グリシン
15	A l a	:	アラニン
	V a l	:	バリン
	L e u	:	ロイシン
	I l e	:	イソロイシン
	S e r	:	セリン
20	T h r	:	スレオニン
	C y s	:	システイン
	M e t	:	メチオニン
	G l u	:	グルタミン酸
	G l n	:	グルタミン
25	A s p	:	アスパラギン酸
	A s n	:	アスパラギン
	L y s	:	リジン
	A r g	:	アルギニン
	H i s	:	ヒスチジン

P h e : フェニルアラニン  
T y r : チロシン  
T r p : トリプトファン  
P r o : プロリン  
5 A s x : A s p + A s n  
G l x : G l u + G l n

以下の参考例および実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

10

参考例 1 (T7 プロモーターを用いたヒト成長ホルモン (hGH) 発現ベクターの構築)

hGH の構造遺伝子は、ヒト下垂体 cDNA ライブラリー (Quick-Clone, CLONTECH 社製) より、構造遺伝子の開始コドン上流に  
15 隣接して Nde I 切断部位を持つプライマー、及び始終コドン下流に隣接して Bam HI 切断部位を持つプライマーを用いて、PCR で増幅して回収した。これにより得られた両端に制限酵素認識部位が付加した hGH 酵素遺伝子を、pT7Blue の T-クローニング部位に連結して (DNA Ligation Kit Ver. 2、宝酒造株式会社製) pT7HGH-Na  
20 Na を作製した。これを、大腸菌 JM109 に導入し、アンピシリン耐性と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。

一方、以下の方法で発現ベクターを構築した。pBR322 を Nde I で切断、T4 DNA ポリメラーゼ (DNA Blunting Kit、宝酒造株式会社製) で末端を平滑化し、再度連結することによって、Nde I  
25 I 認識部位を欠損させた pBRdesNde を作製した。pET3c を Bgl II-Eco RV で切断し、約 0.26 kbp の断片を回収した後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNde の Sca I 断片と連結して、pBR/T7desNde を作製した。また、部位特異的変異導入 (Quick Change, STRATAGENE 社製) によ

り、pBR322のBamHI認識部位を欠損させたpBR322desBamを作製した。pBR322desBamのSphI-EcoRV断片をpBR/T7desNdeのSphI-EcoRV断片と連結してテトラサイクリン耐性発現ベクターpTCを作製した。テトラサイクリン耐性遺伝子とT7プロモーターの向きが逆のものをpTC1、同じものをpTC2とした。

pT7HGH-NaをNdeI及びBamHIで切断してhGH構造遺伝子を回収し、pTC1のNdeI-BamHI断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してアンピシリン耐性で形質転換体を選択、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCHGH-Naとした。

大腸菌MM294を、T7ファージのRNAポリメラーゼ遺伝子で組換えられているラムダファージ（スチュディエ、スプラ）で溶原化した。その後、hGH発現ベクターpTCHGH-Naをこの大腸菌MM294（DE3）へ導入し、大腸菌MM294（DE3）/pTCHGH-Naを得た。なお、hGHの塩基配列は、pT7HGH-Naを作製した時点でABI Prism 377A DNAシーケンサーによって確認した。

参考例2（大腸菌でのメチオニン残基を有するhGH（Met-hGH）の発現）

参考例1で得た形質転換細胞を、5mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1リットルを含む2リットル容フラスコ中で30℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を、0.02%ニューポールLB-625（消泡剤：三洋化成工業製）および5mg/Lのテトラサイクリンを含む20リットルのLB培地を仕込んだ50リットル容発酵槽へ移植して、37℃、6時間通気攪拌培養した。この培養液を360リットルの主発酵培地（1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ

糖、3.0%ハイケースアミノ、1.0%酵母エキス)を仕込んだ500リットル容発酵槽に移植して、37℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で17.85mg/L分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTQ)を添加し、さらに2  
5 4リットルの30%ブドウ糖を添加しながら培養を続け、5時間後に培養液を遠心分離して、約12.3kgの湿菌体を得、-80℃に凍結保存した。

上記の形質転換大腸菌(MM294(DE3), pTCHGH-Na)は、受託番号FERM P-16546として平成9年12月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託され、受託番号F  
10 ERM BP-6888として平成11年9月24日に国際寄託に移管された。また、上記の形質転換大腸菌(MM294(DE3), pTCHGH-Na)は、受託番号IFO 16124として財団法人発酵研究所(IFO)に平成9年10月16日に寄託されている。

#### 15 実施例1 (Met-hGHの活性化)

参考例2で得られた菌体2kgに50mMトリス/HCl、8Mグアニジン塩酸塩溶液(pH8.0)6リットルを加えて菌体を溶解してから超音波  
破砕器(ソニファイアー450、ブランソン社)を用いて破砕処理を行った  
後、遠心分離(10000rpm、120分間)を行った。得られた上澄液  
20 6リットルに50mMトリス/HCl、0.28mMGSSG、1.4mMGSH、0.7Mアルギニン(pH8.0)18リットルを加えてpH8.0に調整した後、4℃で4日間活性化を行った。

#### 実施例2 (Met-hGHの精製)

25 実施例1で活性化の終了した再生液をペリコンカセットシステム(PTGC膜、ミリポア社)で、20mMトリス/HCl、2.5M尿素(pH8.0)を加えながら電気伝導度が10mS以下になるまで脱塩、濃縮を行った後、得られた濃縮液5リットルに50mMリン酸緩衝液(pH6.0)を加えて50リットルに希釈後4℃に一晩静置した。ついで、連続遠心分離(J

CF-Z ロータ、ベックマン社) を行い、得られた上清 50 リットルに 10 M 水酸化ナトリウムを加えて pH 7.12 に調整した後ペリコンカセットシステム (PTGC 膜、ミリポア社) で濃縮し、20 mM トリス/HCl (pH 8.0) に置換後、遠心分離 (10000 rpm, 30 分) を行い上清を得た。ついでこの液を 20 mM トリス/HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE-トヨパール 650 M カラム (20 cm  $\phi$   $\times$  84 cm、東ソー社) に吸着させ、十分に洗浄した後、20 mM トリス/HCl、50 mM 塩化ナトリウム (pH 8.0) で溶出を行い、Met-hGH 画分として 95 リットルの溶出液を得た。さらに、この溶出液をペリコンカセットシステム (PTGC 膜、ミリポア社) で濃縮、脱塩し、20 mM トリス/HCl、6 M 尿素 (pH 8.0) に置換し、12.21 グラムの Met-hGH を得た。

### 実施例 3 (N 末端メチオニン残基 (N 末端 Met) の除去)

実施例 2 で得た Met-hGH 溶液 1800 ミリリットルに 2.5 M グリオキシル酸、40 mM 硫酸銅、50 % ピリジン溶液 450 ミリリットルを加えよく攪拌した後 25℃ で 60 分間反応させた。次いで、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (11.3 cm  $\phi$   $\times$  125 cm、ファルマシアバイオテク社) に 3 リットル/h の流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、メチオニン残基のジケトン体を有する hGH 画分として 4.2 リットルの溶出液を得た。この溶出液を 1.2 M 酢酸、2.4 M ぎ酸ナトリウム、3.6 M 尿素溶液、48 mM 3,4-ジアミノ安息香酸溶液 20.8 リットル中によく攪拌しながら加えた後、30℃ でゆっくり攪拌しながら 3 日間反応させた。反応後、この溶液をペリコンカセットシステム (PTGC 膜、ミリポア社) で 14 リットルに濃縮し、7 リットルずつ 2 回に分けて 20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (25.2 cm  $\phi$   $\times$  50 cm、ファルマシアバイオテク社) に 6 リットル/h の流速で通液し、hGH 画分 20 リットルを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を

DEAE-5PWカラム (21 cm×30 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A=50 mM トリス/HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B=50 mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0) とによる70~85% BのpH勾配で、70分間、320ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分5.84リットルを得た。このhGH画分に10 M NaOH溶液を16ミリリットル加えてpH 7.1に調整後、8回に分けて高速液体クロマトグラフ法 (ギルソンHPLCシステム、ギルソン社) によるクロマトグラフィーを行った。所定量の濃縮液をPOROS 20R1カラム (5 cm×60 cm、日本パーセプティブ社) に通液吸着させた後、A=25% n-プロパノール+75% 50 mM トリス/HCl (pH 8.5)、B=35% n-プロパノール+65% 50 mM トリス/HCl (pH 8.5) とによる50~85% Bの濃度勾配で、150分間、50ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分として34.7リットルの溶出液を得た。この溶出液に蒸留水を加えて200リットルに希釈してからペリコンカセットシステム (PTGC膜、ミリポア社) で5リットルに濃縮後更に、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソンHPLCシステム、ギルソン社) により、この溶液を3回に分けてDEAE-5PWカラム (10.8 cm×20 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A=50 mM トリス/HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B=50 mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0) とによる70~85% BのpH勾配で、70分間、80ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分1616ミリリットルを得た。このhGH画分に10 M NaOH溶液を2ミリリットル加えてpH 7.1に調整後、限外ろ過装置 (オメガ膜、富士フィルター社) で濃縮し、濃縮液0.4リットルを得た。この濃縮液を蒸留水で平衡化したセファクリルS-100カラム (11.3 cmφ×50 cm、ファルマシアバイオテク社) に2リットル/hの流速で通液、展開しhGH画分を得た。更に、この溶液をミリパック60 (ミリポア社) でろ過し、hGH溶液2391ミリリットル (4638ミリグラムのhGH) を得た。

## 実施例 4 (hGHの特徴決定)

## (a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例 3 で得られた hGH に 100 mM DTT を含むサンプルバッファ  
 [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] を等量加えてよく攪拌し、95℃で2分  
 5 間加熱後、マルチゲル 10/20 (第一化学薬品) で電気泳動を行った。泳  
 動後のゲルをクマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie Brilliant Blue)  
 で染色した結果、約 22 KDa に単一のバンドが認められたことから、精製  
 hGH は単一であることが確認された (図 1)。

## 10 (b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (パーキンエルマー・  
 アプライドバイオシステムズ社、モデル 477A) を用いて決定した。その  
 結果、得られた hGH の N末端アミノ酸配列は cDNA の塩基配列から推定  
 された hGH の N末端アミノ酸配列と一致した (表 1)。

15

表 1

	残基No.	検出された	hGHの塩基配列
		PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	から予測される アミノ酸
20	1	Phe (848)	Phe
	2	Pro (520)	Pro
	3	Thr (403)	Thr
	4	Ile (620)	Ile
	5	Pro (401)	Pro
25	6	Leu (429)	Leu
	7	Ser ( 92)	Ser
	8	Arg (262)	Arg
	9	Leu (376)	Leu
	10	Phe (283)	Phe



	11	Asp (182)	Asp
	12	Asn (175)	Asn
	13	Ala (175)	Ala
	14	Met (194)	Met
5	15	Leu (261)	Leu
	16	Arg (181)	Arg
	17	Ala (144)	Ala
	18	His (80)	His
	19	Arg (152)	Arg
10	20	Leu (200)	Leu
	21	His (71)	His

1) フェニルチオヒダントイン

1 nmol を用いて分析を行った。

#### 15 (c) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (L-8500A, 日立) を用いて決定した。その結果、得られた hGH のアミノ酸組成は cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した (表 2)。

20 表 2

	アミノ酸	1モル当たりの 残基数	hGHの塩基配列 から予測される値
	Asx	19.8	20
	Thr <sup>1)</sup>	9.7	10
25	Ser <sup>1)</sup>	16.1	18
	Glx	27.0	27
	Pro	7.7	8
	Gly	8.0	8
	Ala	6.9	7

24

	Cys <sup>2)</sup>	N. D.	4
	Val	6. 8	7
	Met	2. 9	3
	Ile	7. 4	8
5	Leu	26. 6	26
	Tyr	7. 9	8
	Phe	12. 4	13
	His	3. 0	3
	Lys	8. 7	9
10	Arg	10. 7	11
	Trp	0. 9	1

酸加水分解 (6N HCl-4%トリカリン酸、110℃、24及び48時間加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値。2) 未検出

15 約10 $\mu$ gを用いて分析をおこなった。

#### (d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (L-8500A, 日立) を用いて決定した。得られたhGHのC末端アミノ酸はcDNAの塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した (表3)。

20

表 3

C末端アミノ酸	回収率 (%)
Phe	94

25 気相ヒドラジン分解法 (100℃、6時間)  
20nmolを用いて分析を行った。

#### 実施例 5 (hGHの活性測定)

実施例 3 で得られた精製 hGH の Nb2 細胞 [ジャーナル・オブ・クリニ

カル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム、51巻、1058頁(1980)]に対する増殖促進効果は、標準品(ケミコンインターナショナル社、Temecula, California, USA)と同等であった。

#### 5 実施例6 (N末端Metの除去)

実施例3で得たメチオニン残基のジケトン体を有するhGH画分0.4ミリリットルに20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)を加えて2ミリリットルに希釈した。この希釈液に等量の4M酢酸、4M酢酸ナトリウム、6M尿素溶液、80mM N-メチル-1,2-フェニレンジアミン  
10 溶液を加え、よく攪拌した後30℃で20時間反応させた。反応後、この溶液を20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1cmφ×30cm、ファルマシア社)に60ミリリットル/hの流速で通液し、hGH画分10ミリリットルを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法(ギルソンHPLCシステム、ギルソン  
15 社)により、この溶液をDEAE-5PWカラム(2.15cm×15cm、東ソー社)に通液吸着させた後、A=50mMトリス/HCl+2.5M尿素(pH8.0)、B=50mM MES[2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]+2.5M尿素(pH4.0)とによる70~85%BのpH勾配で、70分間、7.5ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGHを得た。

20

#### 実施例7 (N末端Metの除去)

実施例3で得たメチオニン残基のジケトン体を有するhGH画分0.4ミリリットルに20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)を加えて2ミリリットルに希釈した。この希釈液に等量の2M酢酸、4Mギ酸ナトリウム、6M尿素溶液、80mM N-メチル-1,2-フェニレンジアミン  
25 溶液を加え、よく攪拌した後30℃で20時間反応させた。反応後、この溶液を20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1cmφ×30cm、ファルマシア社)に60ミリリットル/hの流速で通液し、hGH画分10ミリリットルを集めた。

ついで、高速液体クロマトグラフ法（ギルソンHPLCシステム、ギルソン社）により、この溶液をDEAE-5PWカラム（2.15cm×15cm、東ソー社）に通液吸着させた後、A=50mMトリス/HCl+2.5M尿素（pH8.0）、B=50mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]+2.5M尿素（pH4.0）とによる70～85% BのpH勾配で、70分間、7.5ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGHを得た。

#### 実施例8（N末端Metの除去）

実施例2で得たMet-hGH溶液1.8mlに2.5Mグリオキシル酸、40mM硫酸銅、50%ピリジン溶液0.45mlを加えよく攪拌した後25℃で60分間反応させた。ついで、20mMトリス/HCl、4.0M尿素（pH8.0）で平衡化したセファデックスG-25カラム（1.5cmφ×30cm、ファルマシアバイオテク社）に100ml/hの流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、メチオニン残基のジケトン体を有するhGH画分として10mlの溶出液を得た。この溶出液を1.2M酢酸、2.4Mギ酸ナトリウム、3.6M尿素溶液、48mM 3,4-ジアミノ安息香酸溶液49.5ml中によく攪拌しながら加えた後、37℃でゆっくり攪拌しながら24時間反応させた。反応後、20mMトリス/HCl、4.0M尿素（pH8.0）で平衡化したセファデックスG-25カラム（4.6cmφ×60cm、ファルマシアバイオテク社）に500ml/hの流速で通液し、hGH画分150mlを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法（ギルソンHPLCシステム、ギルソン社）により、この溶液をDEAE-5PWカラム（2.15cm×15cm、東ソー社）に通液吸着させた後、A=50mMトリス/HCl+2.5M尿素（pH8.0）、B=50mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]+2.5M尿素（pH4.0）とによる70～85% BのpH勾配で、70分間、7.5ml/分の流速で溶出を行い、6.7mgのhGHを得た。

#### 実施例9（N末端Metの除去）

実施例 2 で得た Met-hGH 溶液 1.8 ml に 2.5 M グリオキシル酸、40 mM 硫酸銅、50 % ピリジン溶液 0.45 ml を加えよく攪拌した後 25℃ で 60 分間反応させた。ついで、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 cm  $\phi$   $\times$  30 cm、ファルマシアバイオテク社) に 100 ml/h の流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、メチオニン残基のジケトン体を有する hGH 画分として 10 ml の溶出液を得た。この溶出液を 2 M ぎ酸、10 M ぎ酸ナトリウム、6 M 尿素溶液、80 mM 3,4-ジアミノ安息香酸溶液 10 ml 中によく攪拌しながら加えた後、30℃ でゆっくり攪拌しながら 3 日間反応させた。反応後、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (4.6 cm  $\phi$   $\times$  60 cm、ファルマシアバイオテク社) に 500 ml/h の流速で通液し、hGH 画分 100 ml を集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を DEAE-5PW カラム (2.15 cm  $\times$  15 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A = 50 mM トリス/HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B = 50 mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0) とによる 70-85 % B の pH 勾配で、70 分間、7.5 ml/分の流速で溶出を行い、6.0 mg の hGH を得た。

実施例 10 (メチオニン残基を有する 20K-hGH (Met-20K-hGH) の活性化)

特開平 10-234386 号の参考例 2 記載の方法で得られた菌体 40 g に PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) 100 ミリリットルを加えて懸濁した後、5 分間、超音波破碎 (ブランソン社) を行い菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離 (10000 rpm、20 分間) して上清を廃棄し、封入体を得た。この封入体に 50 mM トリス/HCl、8 M グアニジン塩酸塩溶液 (pH 8.0) 2 リットルを加えて封入体を溶解後、遠心分離 (10000 rpm、120 分間) を行った。得られた上清液 2 リットルに 50 mM トリス/

HCl、0.28mM GSSG、1.4mM GSH、0.7M アルギニン (pH 8.0) 24リットルを加えて、4℃で1日間活性化を行った。

#### 実施例 11 (Met-20K-hGHの精製)

- 5 実施例 10で活性化の終了した液をミニタン限外濾過システム (PTGC 膜、ミリポア社) で20mM トリス/HCl、2.5M 尿素 (pH 8.0) を加えながら電気伝導度が10mS/cm以下になるまで脱塩、濃縮を行った後、得られた濃縮液を遠心分離 (10000rpm、20分間) し、濃縮液の上清150ミリリットルを得た。ついでこの液を50mM トリス/HCl、2.5M 尿素/10%アセトニトリル (pH 8.2) で平衡化した HiLoad™ Q Sepharose 16/10 HP カラム (1.6cm Φ x 10 cm、ファルマシア・バイオテク社) に吸着させ、十分に洗浄した後、0~0.18M 塩化ナトリウムの濃度勾配により流速3.0ミリリットル/分で溶出を行い、Met-20K-hGH画分として28ミリリットルの溶出液を得た。さらにこの画分をセントリプラスー10 (ミリポア社) で濃縮・脱塩を行い、濃縮液15ミリリットルを得た。この液を再度、50mM トリス/HCl、2.5M 尿素/10%アセトニトリル (pH 8.2) で平衡化した HiLoad™ Q Sepharose 16/10 HP カラム (1.6cm Φ x 10 cm、ファルマシア・バイオテク社) に吸着させ、十分に洗浄した後、A=50mM トリス/HCl、2.5M 尿素、10%アセトニトリル (pH 8.2) 及びB=50mM MES [2-(N-メチル)イタンスルホン酸]、2.5M 尿素、10%アセトニトリル (pH 4.0) とによる0~100% BのpH勾配で60分間、流速3.0ミリリットル/分で溶出を行い、Met-20K-hGH画分12ミリリットルを得た。この溶出液に2M トリス/HCl (pH 7.8) を0.6ミリリットル加えてpHを7.2に調整し、セントリプラスー10 (ミリポア社) で濃縮を行った。この濃縮液0.5ミリリットルを10%エタノールを含むPBSで平衡化した Superdex™ 75 HR 10/30 (1.0cm Φ x 30 cm、ファルマシア・バイオテク社) に添加し、10%エタノールを含むPBSで溶出し、Met-20K-hGH画分7.5ミリリットルを得た。

## 実施例 1 2 (N末端Metの除去)

実施例 1 1 によって得たMet-20K-hGH溶液6ミリリットルを20mMトリス/HCl、8M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(10mm ID x 30cm、ファルマシアバイオテク社)に通液し、溶出してきたMet-20K-hGH画分を集め、更に限外濾過システム(ダイアフローメンブレンYM10、25mm、アミコン社)を使って2ミリリットルに濃縮した。この溶液に2.5Mグリオキシル酸、40mM硫酸銅、50%ピリジン溶液0.5ミリリットルを加えよく攪拌した後25℃で60分間反応させた。次いで、この反応液を20mMトリス/HCl、4M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(10mm ID x 40cm、ファルマシアバイオテク社)に通液し、メチオニン残基のジケトン体を有する20K-hGH画分として4ミリリットルの溶出液を集めた。この溶出液に1.2M酢酸、2.4Mギ酸ナトリウム、3.6M尿素、48mM3,4-ジアミノ安息香酸溶液20ミリリットルを加えよく攪拌した後30℃で65時間反応した。反応後、20mMトリス/HCl、4M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(20mm ID x 40cm、ファルマシアバイオテク社)に通液し、20K-hGH画分を集めた後、更に高速液体クロマトグラフ法(ギルソンHPLCシステム、ギルソン社)により、この溶液を50mMトリス/HCl、2.5M尿素/10%アセトニトリル(pH8.2)で平衡化したHiLoad™ Q Sepharose 16/10 HPカラム(1.6cm Φ x 10cm、ファルマシアバイオテク社)に吸着させ、十分に洗浄した後、A=50mMトリス/HCl、2.5M尿素、10%アセトニトリル(pH8.2)及びB=50mM MES[2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]、2.5M尿素、10%アセトニトリル(pH4.0)とによる0~100%BのpH勾配で60分間、流速3.0ミリリットル/分で溶出を行い、20K-hGH画分12ミリリットルを得た。この溶出液に2Mトリス/HCl(pH7.8)を0.6ミリリットル加えてpHを7.2に調整した後、セントリプラス-10(ミリポア社)で濃縮を行った。こ

の濃縮液 0.5 ミリリットルを 10 % エタノールを含む P B S で平衡化した Superdex<sup>TM</sup> 75 HR 10/30 (1.0 cm Φ x 30 cm、ファルマシア・バイオテク社) に添加し、10 % エタノールを含む P B S で溶出し、20 K-hGH 画分 7.5 ミリリットルを得た。

5

### 実施例 13 (20 K-hGH の特徴決定)

#### (a) N 末端アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社、モデル 477A) を用いて決定した。その  
10 結果、得られた 20 K-hGH の N 末端アミノ酸配列は cDNA の塩基配列から推定された 20 K-hGH の N 末端アミノ酸配列と一致した (表 4)。

表 4

残基No.	検出された PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	20K-hGH の 塩基配列から予測 されるアミノ酸
15	1 Phe (642)	Phe
	2 Pro (504)	Pro
	3 Thr (342)	Thr
20	4 Ile (410)	Ile
	5 Pro (200)	Pro
	6 Leu (378)	Leu
	7 Ser (95)	Ser
25	8 Arg (170)	Arg
	9 Leu (285)	Leu
	10 Phe (262)	Phe

1) フェニルチオヒダントイン

1 nmol の試料を用いて分析を行った。



## (b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計（システム 6300，ベックマン社）を用いて決定した。その結果、実施例 12 で得られた 20K-hGH のアミノ酸組成は 20K-hGH の cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した（表 5）。

表 5

	アミノ酸	1 モル当たりの	20K-hGH の塩基
		残基数	配列から予想される値
10	Asx	20.2	20
	Thr <sup>1)</sup>	9.7	10
	Ser <sup>1)</sup>	16.5	17
	Glx	22.0	22
	Pro	6.9	7
15	Gly	8.0	8
	Ala	6.2	6
	Cys <sup>2)</sup>	N. D.	4
	Val	7.0	7
	Met	2.9	3
20	Ile	6.5	7
	Leu	24.3	25
	Tyr	5.9	6
	Phe	12.2	12
	His	3.1	3
25	Lys	7.1	7
	Arg	10.7	11
	Trp	N. D.	1

酸加水分解（6N HCl-1%フェノール、110℃、24及び48時間加水分解の平均値）。約20μgを用いて分析をおこなった。

1) 0時間に外挿した値。2) 未検出

#### 実施例 14 (20K-hGHの活性測定)

5 実施例 12 で得られた 20K-hGH の Nb2 細胞 [ジャーナル・オブ・  
クリニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム、51 巻、105  
8 頁 (1980)] に対する増殖促進効果のあることを確認した。

#### 実施例 15

(メチオニン残基を有するヒトBTC (ヒトMet-BTC) の製造)

10 特開平 6-87894 号 (EP-A-0555785 号) の実施例 4~6、  
8 および 13 に記載の方法に準じて、下記の方法でヒトMet-BTC を製  
造した。

(大腸菌のヒトBTC cDNA 発現プラスミドの構築)

15 ヒト・プロBTC (1-147 アミノ酸残基) をコードする 0.6 Kb の  
EcoRI-BamHI 断片を、特開平 6-87894 号 (EP-A-05  
55785 号) の実施例 5 に記載のプラスミド pTB1515 から単離した。  
ATG 翻訳開始コドン (5'-TATGGATGGG-3'; 5'-AAT  
TCCCATCCA-3') を有する合成アダプターを上記 0.6 Kb 断片  
の EcoRI 部位に連結した後、生成した 0.6 Kb NdeI-BamH  
20 I 断片を、T7 プロモーター (Gene, 56 巻、125 頁 (1987 年))  
を含有するプラスミド pET-3c 中へ挿入し、プラスミド pTB1505  
を構築した。

25 ヒトBTC の 80 アミノ酸残基 (特開平 6-87894 号 (EP-A-0  
555785 号) の図 10-1~図 10-2 の 1 (Asp) から 80 (Ty  
r) まで) をコードする DNA 断片を得るため、鋳型としてプラスミド pT  
B1505、プライマーとして 2 個のオリゴヌクレオチド (5'-ATAC  
ATATGGATGGGAATTCCA-3'; 5'-CCGGATCCT  
AGTAAACAAGTCAACTCT-3') を用いて PCR

(polymerase chain reaction) を行った。生成物を NdeI および BamH

Iで消化し、2.0%アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とする0.25 Kb DNA断片を単離した。この0.25 Kb Nde I - BamHI断片を、pET-3cのT7プロモーターの下流にT4 DNAリガーゼを用いて連結しプラスミドpTB1516を得た（特開平6-87894号（EP-A-0555785号）の図13参照）。

（大腸菌でのヒトMet-BTCの発現）

大腸菌MM294を、T7ファージのRNAポリメラーゼ遺伝子で組み換えられているラムダファージ（スチュディエ、スプラ）で溶原化した。その後、プラスミドpLysSをこの大腸菌MM294（DE3）へ導入し、大腸菌MM294（DE3）/pLysSを得た。この菌体に上記参考例で得られたプラスミドpTB1516を導入し、大腸菌MM294（DE3）/pLysS, pTB1516を得た。

この形質転換細胞を、50  $\mu$ g/mlのアンピシリンと15  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1リットルを含む2リットル容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液を19リットルの主発酵培地（1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第一鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸）を仕込んだ50リットル容発酵槽へ移植して、30℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、100mg/リットル分のイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加し、さらに培養を続け、7時間後に培養を終了した。この培養終了液を遠心分離して、約340gの湿菌体を得、-80℃に凍結保存した。

この形質転換大腸菌MM294（DE3）/pLysS, pTB1516は、受託番号FERM BP-3836として平成4年4月21日に通商産業省工業技術院生命工学工業研究所（NIBH）に寄託され、また受託番号IFO 15282として平成4年4月16日に財団法人発酵研究所（IF

○) に寄託されている。

上述の方法により取得したN末端にメチオニン残基を有するヒトベータセルリン (Met-BTC) 10mgを3M尿素溶液4mlに溶解した後、80mM硫酸銅 0.25ml、グリオキシル酸 0.25g、ピリジン 0.5mlの混合液を加え、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を2.5M尿素+50mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(25mmID×600mmL)に通液し、平衡化に用いた溶液を6ml/分の流速で展開し、メチオニン残基のジケトン体を有するBTC画分をプールした。続いてこの画分に等量の2M酢酸、4Mギ酸ナトリウム、3M尿素溶液を加えた後、3、4-ジアミノ安息香酸を40mM濃度になるように添加して、脱気、窒素ガスシールを行い、25℃で5日間反応した。反応終了後、反応液を50mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(46mmID×600mmL)に通液し、平衡化に用いた緩衝液を10ml/分の流速で展開し、N末端にメチオニンの付加していないBTC画分をプールした。プールしたBTC画分をpH6.0に調整後、50mMリン酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素(pH5.0)で平衡化したCM-5PW(21.5mmID×150mmL、東ソー(株))に吸着した後、0-100%B(B=50mMほう酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素、pH9.0)の段階勾配で60分間、6ml/分の流速で溶出を行い、BTC画分をプールした。さらに、BTC画分を0.1%TFAで平衡化したC4P-50(10mmID×250mmL、昭和電工(株))に吸着した後、20-60%B(B=80%アセトニトリル/0.1%TFA)の段階勾配で40分間、2ml/分の流速で溶出した。BTCのフラクションをプールした後、凍結乾燥を行い、BTC約2.6mgを得た。

25

#### 実施例16 (BTCの特徴決定)

##### a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例15で得られたBTCをSample buffer [Laemmli, ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]に懸濁し100℃で1分間加熱した後、マルチゲル1

5 / 2 5 (第一化学薬品(株))で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue)で染色したところ、単一バンドの蛋白が認められ、精製品はほぼ単一であった(図2)。

5 b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(アプライドバイオシステム モデル477A)を用いて決定した。その結果、得られたBTCのcDNAの塩基配列から推定したBTCのN末端アミノ酸配列と一致した(表6)。

10 表 6

	残基 No.	検出された PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	BTC の塩基配列 から予測される (pmol)アミノ酸
15	1	Asp (261)	Asp
	2	Gly (457)	Gly
	3	Asn (300)	Asn
	4	Ser (107)	Ser
	5	Thr (75)	Thr
	6	Arg (181)	Arg
20	7	Ser (121)	Ser
	8	Pro (245)	Pro
	9	Glu (55)	Glu
	10	Thr (71)	Thr
25	11	Asn (133)	Asn
	12	Gly (149)	Gly
	13	Leu (132)	Leu
	14	Leu (155)	Leu
	15	N. D.	Cys
	16	Gly (111)	Gly

17	Asp (70)	Asp
18	Pro (65)	Pro
19	Glu (29)	Glu
20	Glu (64)	Glu

5 1 nmol を用いて分析を行った。

N. D. 未検出

1) フェニールチオヒダントイン

c) アミノ酸組成分析

10 アミノ酸組成をアミノ酸分析計(ベックマン システム6300E)を用いて決定した。その結果、BTCのcDNAの塩基配列から推定したアミノ酸組成と一致した(表7)。

表7

15	1モル当たりの		BTCの塩基配列 から予測される値
	アミノ酸	残基数	
	Asx	7.0	7
	Thr <sup>1)</sup>	6.1	6
	Ser <sup>1)</sup>	4.8	5
20	Glx	9.3	9
	Pro	3.8	4
	Gly	7.1	7
	Ala	4.0	4
	Cys <sup>2)</sup>	N. D.	8
25	Val	3.9	4
	Met	0	0
	Ile	1.9	2
	Leu	3.0	3
	Tyr	3.7	4

	P h e	3. 3	3
	H i s	2. 3	2
	L y s	5. 0	5
	A r g	6. 9	7
5	T r p	0	0

酸加水分解 (6N塩酸 1%フェノール 110℃、24・48時間、加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

ca. 20  $\mu$ gを用いて分析を行った。

10

d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (ベックマン システム6300E) を用いて決定した。得られたBTCはcDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致した (表8)。

15

表8 : C末端アミノ酸分析

	C末端アミノ酸	回収率 (%)
BTC	Tyr	44. 6

気相ヒドラジン分解法 (100℃, 3. 5時間)

15 nmolを用いて分析を行った。

20

e) BTCの生物活性

精製品はモレキュラー・セル・バイオロジー、8、588 (1988) に記載の方法により、BALB/C3T3 A31-714 クローン4 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12、463 (1973)) を用いた活性測定を行い、標準品と同等の活性を有することを確認した。

25

実施例17

特開平10-72489号 (EP-A-812856号) の参考例5の方

法により取得したN末端にメチオニン残基を有するヒトインターロイキン-2 (Met-IL-2) 50mgを4M尿素溶液40mlに溶解した後、100mM硫酸銅2.5ml、グリオキシル酸 2.5g、ピリジン 5.0mlの混合液を加え、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を10mMリン酸緩衝液+2.5M尿素 (pH 5.0) で平衡化したセファデックス (Sephadex) G-25カラム (46mmID×600mmL) に通液し、平衡化に用いた溶液を10ml/分の流速で展開し、メチオニン残基のジペプチドを有するIL-2画分をプールした。続いてこの画分に等量の2M酢酸、4Mギ酸ナトリウム、3M尿素溶液を加えた後、3、4-ジアミノ安息香酸を40mM濃度になるように添加して、脱気、窒素ガスシールを行い、25℃で5日間反応した。反応終了後、反応液を10mMリン酸緩衝液+2.5M尿素 (pH 5.0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (46mmID×600mmL) に通液し、平衡化に用いた緩衝液を10ml/分の流速で展開し、N末端にメチオニンの付加していないIL-2画分をプールした。プールしたIL-2画分を、25mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したSP-5 P.W (21.5mmID×150mmL、東ソー (株)) に吸着した後、30-80% B (B=25mMリン酸緩衝液、pH 8.0) の段階勾配で60分間、6ml/分の流速で溶出を行い、17.3mgのIL-2画分を得た。

## 20 実施例18 (IL-2の特徴決定)

### a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例17で得られたIL-2をSample buffer [Laemmli, ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に懸濁し100℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25 (第一化学薬品 (株)) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue) で染色したところ、単一バンドの蛋白が認められ、精製品はほぼ単一であった (図3)。

### b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステム モデル477A) を用いて決定した。その結果、得られたIL-2のcDNAの塩基配



列から推定した I L - 2 の N 末端アミノ酸配列と一致した (表 9)。

表 9

5	残基 No.	検出された	IL-2 の塩基配列
		PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	から予測される アミノ酸
	1	A l a (701)	A l a
	2	P r o (354)	P r o
	3	T h r (359)	T h r
10	4	S e r (122)	S e r
	5	S e r (128)	S e r
	6	S e r (78)	S e r
	7	T h r (46)	T h r
	8	L y s (176)	L y s
15	9	L y s (61)	L y s
	10	T h r (40)	T h r

1 nmol を用いて分析を行った。

1) フェニールチオヒダントイン

## 20 c) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (ベックマン システム6300E) を用いて決定した。その結果、I L - 2 の c D N A の塩基配列から推定したアミノ酸組成と一致した (表 10)。

25 表 10

アミノ酸	1 モル当たりの	IL-2 の塩基配列
	残 基 数	から予測される値
A s x	11.8	12

	Thr <sup>1)</sup>	12.9	13
	Ser <sup>1)</sup>	7.0	8
	Glx	18.4	18
	Pro	4.8	5
5	Gly	2.0	2
	Ala	4.8	5
	Cys <sup>2)</sup>	N. D.	3
	Val	3.5	4
	Met	3.8	4
10	Ile	7.7	9
	Leu	22.0	22
	Tyr	2.8	3
	Phe	5.6	6
	His	2.9	3
15	Lys	10.3	11
	Arg	3.7	4
	Trp	0.9	1

酸加水分解 (6N塩酸-4%チオグリコール酸、110℃、24・48時間、加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値

20 2) 未検出

#### d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計(ベックマン システム6300E)を用いて決定した。  
得られたIL-2はcDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致  
25 した(表11)。

表11: C末端アミノ酸分析

IL-2	C末端アミノ酸	回収率 (%)
	Thr	32.5

気相ヒドラジン分解法（100℃，3．5時間）

15 nmolを用いて分析を行った。

e) IL-2の生物活性

- 5 生物活性測定は、IL-2依存細胞を用いる日沼らの方法〔バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ

（Biochem. Biophys. Res. Commun. ），109, 363 (1982)〕に従って行い、標準品と同等の活性を有することを確認した。

10 実施例19（Met-hGHの活性化）

- 参考例2で得られた菌体1 kgに50 mMトリス／酢酸、8 Mグアニジン塩酸塩溶液（pH 8．5）4リットルを加えて菌体を溶解した後、遠心分離（10,000 rpm）を行った。得られた上清液約4リットルに50 mMトリス／酢酸、1．09 mM還元型グルタチオン、0．055 mM酸化型グルタチオン、109 mMアルギニン、4．36 M尿素溶液（pH 8．0）4リットルを加えて、4℃で3日間活性化を行った。活性化の終了した液をペリコンカセットシステム（バイオマックス8膜、ミリポア社）で、20 mMトリス／酢酸、2．5 M尿素溶液（pH 8．0）約25リットルを加えながら電気伝導度が5 mS／cm以下になるまで濃縮脱塩を行った。再度、20 mMトリス／酢酸溶液（pH 8．0）約35リットルを加えながら脱塩を行った後、遠心分離（10,000 rpm）を行い上清を得た。ついで、上清液を20 mMトリス／酢酸溶液（pH 8．0）で平衡化したDEAE-トヨパール650 Mカラム（30 cmφ×60 cm、東ソー社）に吸着させ、20 mMトリス／酢酸溶液（pH 8．0）および20 mMトリス／酢酸、25 mM塩化ナトリウム溶液（pH 8．0）で十分に洗浄した後、20 mMトリス／酢酸、55 mM塩化ナトリウム溶液（pH 8．0）で溶出を行い、Met-hGH画分として50リットルの溶出液を得た。この溶出液をペリコンカセットシステム（バイオマックス8膜、ミリポア社）で濃縮脱塩し、Met-hGHを得た。

## 実施例 20 (Met-hGHの活性化)

参考例 2 で得られた菌体 1 kg に 50 mM トリス／酢酸、8 M グアニジン塩酸塩溶液 (pH 8.5) 4 リットルを加えて菌体を溶解した後、遠心分離 (10,000 rpm) を行った。得られた上清液約 4 リットルに 50 mM トリス／酢酸、5.45 mM システイン塩酸塩一水和物、109 mM アルギニン、4.91 M 尿素溶液 (pH 8.0) 44 リットルを加えて、4℃で3日間活性化を行った。活性化された Met-hGH の量は実施例 19 の約 1.2 倍多く得られた。活性化の終了した液をペリコンカセットシステム (バイオマックス 8 膜、ミリポア社) で、20 mM トリス／酢酸、2.5 M 尿素溶液 (pH 8.0) 25 リットルを加えながら電気伝導度が 5 mS/cm 以下になるまで濃縮脱塩を行った。再度、20 mM トリス／酢酸溶液 (pH 8.0) 35 リットルを加えながら脱塩を行った後、遠心分離 (10,000 rpm) を行い上清を得た。ついで、上清液を 20 mM トリス／酢酸溶液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE-トヨパール 650 M カラム (30 cm φ × 60 cm、東ソー社) に吸着させ、20 mM トリス／酢酸溶液 (pH 8.0) および 20 mM トリス／酢酸、25 mM 塩化ナトリウム溶液 (pH 8.0) で十分に洗浄した後、20 mM トリス／酢酸、55 mM 塩化ナトリウム溶液 (pH 8.0) で溶出を行い、Met-hGH 画分として 50 リットルの溶出液を得た。この溶出液をペリコンカセットシステム (バイオマックス 8 膜、ミリポア社) で濃縮脱塩し、Met-hGH を得た。

## 実施例 21 (Met-hGHの活性化)

参考例 2 で得られた菌体 1.25 g に 50 mM トリス／酢酸、8 M グアニジン塩酸塩溶液 (pH 8.5) 5 ミリリットルを加えて菌体を溶解した後、遠心分離 (10,000 rpm) を行った。得られた上清液約 5 ミリリットルに 50 mM トリス／酢酸、5.45 mM N-アセチル-L-システイン、109 mM アルギニン、4.91 M 尿素溶液 (pH 8.0) 55 ミリリットルを加えて、4℃で3日間活性化を行った。その結果、システイン塩酸塩一水

和物を添加した場合（実施例 20）と同等のMet-hGHの活性化効率が認められた。

#### 実施例 22（Met-hGHの活性化）

- 5      参考例 2 で得られた菌体 1.25 g に 50 mM トリス／酢酸、8 M グアニジン塩酸塩溶液（pH 8.5）5 ミリリットルを加えて菌体を溶解した後、遠心分離（10,000 rpm）を行った。得られた上清液約 5 ミリリットルに 50 mM トリス／酢酸、5.45 mM システアミン塩酸塩、109 mM アルギニン、4.91 M 尿素溶液（pH 8.0）55 ミリリットルを加えて、  
10      4℃で3日間活性化を行った。その結果、システイン塩酸塩一水和物を添加した場合（実施例 20）と同等のMet-hGHの活性化効率が認められた。

#### 実施例 23

- 特開平 10-72489 号（EP-A-812856 号）の参考例 3 記載  
15      の方法により、N 末端にメチオニン残基を有するヒトニューロトロフィン-3（Met-NT-3）を製造した。

- N 末端にメチオニンの付加したヒトニューロトロフィン-3（Met-NT-3）50 mg を 3 M 尿素溶液 8 ml に溶解し、0.2 M 硫酸銅 0.4 ml、グリオキシル酸 0.5 g、ピリジン 1 ml の混合液を加え 10 ml にし  
20      た後、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を 2.5 M 尿素 + 10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化したセファデックス（Sephadex）G-25 カラム（25mmID×600mmL）に通液し、平衡化に用いた溶液を 4 ml／分の流速で展開し、メチオニン残基のジケトン体を有する NT-3 画分をプールした。続いてこの画分に等量の 2 M 酢酸、4 M ギ酸ナトリウム、  
25      3 M 尿素溶液を加えた後、3,4-ジアミノ安息香酸を 40 mM 濃度になるように添加して、25℃で5日間反応した。反応終了後、反応液を 2.5 M 尿素 + 10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化したセファデックス G-25 カラム（46mmID×600mmL）に通液し、平衡化に用いた緩衝液を 10 ml／分の流速で展開し、N 末端にメチオニン残基を有していないヒトニュー

ロトロフィン-3 (NT-3) 画分をプールした。プールしたNT-3画分  
 をpH 5.0に調整後、50mMリン酸緩衝液+0.2M NaCl+2.5  
 M尿素 (pH 5.0) で平衡化したCM-5PW (21.5mmID×150mmL、東ソ  
 ー (株)) に吸着した後、0-100%B (B=50mMリン酸緩衝液+0.  
 5 2M NaCl+2.5M尿素、pH 8.0) の段階勾配で60分間、6ml  
 /分の流速で溶出を行い、NT-3画分をプールした。さらに、NT-3画  
 分を0.1%TFAで平衡化したC4P-50 (21.5mmID×300mm  
 mL、昭和電工 (株)) に吸着した後、20-60%B (B=80%アセト  
 ニトリル/0.1%TFA) の段階勾配で40分間、5ml/分の流速で溶出  
 10 した。NT-3のフラクションをプールした後、凍結乾燥を行い、NT-3  
 の凍結乾燥粉末約5mgを得た。

#### 実施例24 (NT-3の特徴決定)

##### a) N末端アミノ酸配列分析

15 N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アプライドバイオシ  
 ステムズモデル477A) を用いて決定した。その結果、cDNAの塩基配列  
 から推定したNT-3のN末端アミノ酸配列と一致した (表12)。

表12

20	残基 No.	検出された	NT-3の塩基配列
		PTH <sup>*</sup> -アミノ酸 (pmol)	から予測される アミノ酸
	1	T y r (410)	T y r
	2	A l a (521)	A l a
25	3	G l u (155)	G l u
	4	H i s (213)	H i s
	5	L y s (587)	L y s
	6	S e r ( 91)	S e r
	7	H i s (161)	H i s

	8	A r g (318)	A r g
	9	G l y (214)	G l y
	1 0	G l u (108)	G l u
	1 1	T y r (104)	T y r
5	1 2	S e r ( 50)	S e r
	1 3	V a l (208)	V a l
	1 4	N. D.	C y s
	1 5	A s p ( 99)	A s p
	1 6	S e r ( 41)	S e r
10	1 7	G l u ( 24)	G l u
	1 8	S e r ( 27)	S e r
	1 9	L e u ( 63)	L e u
	2 0	T r p ( 26)	T r p

1 nmol を用いて分析を行った。

15 N. D. 未検出

\*) フェニールチオヒダントイン

#### b) アミノ酸組成分析

20 アミノ酸組成をアミノ酸分析計(ベックマン システム6300E)を用いて決定した。その結果、NT-3 の cDNA の塩基配列から推定したアミノ酸組成と一致した(表13)。

表 1 3

	アミノ酸	1 モル当たりの 残 基 数	NT-3 の塩基配列 から予測される値
25	A s x	1 1 . 0	1 1
	T h r *)	8 . 7	9
	S e r *)	1 0 . 4	1 2
	G l x	1 1 . 0	1 1

	P r o	1 . 7	2
	G l y	8 . 0	8
	A l a	4 . 8	5
	C y s	N . D .	6
5	V a l	8 . 7	9
	M e t	0	0
	I l e	6 . 7	7
	L e u	5 . 0	5
	T y r	5 . 1	5
10	P h e	1 . 2	1
	H i s	4 . 3	4
	L y s	9 . 7	10
	A r g	9 . 6	10
	T r p	3 . 8	4

15 酸加水分解（6 N塩酸－4%チオグリコール酸 110℃、  
24・48時間、加水分解の平均値）

N . D . 未検出

\* ) 0時間に外挿した値

ca. 20  $\mu$ g を用いて分析を行った。

20

#### d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計(ベックマンシステム6300E)を用いて決定した。その結果cDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致した(表14)。

25

表14

	C末端アミノ酸	回収率
NT-3		(%)
	T h r	42.0



気相ヒドラジン分解法（100℃，3.5時間）

15 nmol を用いて分析を行った。

e) NT-3 の生物活性

- 5 実施例23で得られたNT-3についてDRG（ニワトリ有精卵をふ卵器で37.5℃、8-10日間揺卵して、胚発生を行った胎児から摘出した後神経節（Dorsal root ganglia）を用いた生物活性測定を行い、CHO細胞より得られたNT-3と同等の活性を有することを確認した。

10

#### 実施例25

- 15 実施例2で得られたMet-hGH溶液14.75mlを6M尿素溶液で60mlにした後、0.5M硫酸銅1.2ml、グリオキシル酸3.75g、ピリジン7.5mlの混合液を加え75mlにした後、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を4M尿素+20mMトリス緩衝液（pH8.0）で平衡化したセファデックス（Sephadex）G-25カラム（4.6cmID×60cmL）に通液し、平衡化に用いた溶液を10ml/分の流速で展開し、メチオニン残基のジケトン体を有するhGH画分をプールした。続いてこの画分に等量の2M酢酸、4Mギ酸ナトリウム、4M尿素溶液
- 20 を加えた後、3,4-ジアミノ安息香酸を40mM濃度になるように添加して、30℃で4日間反応した。反応終了後、反応液を4M尿素+20mMトリス緩衝液（pH8.0）で平衡化したセファデックスG-25カラム（11.3cmID×80cmL）に通液し、平衡化に用いた緩衝液を30ml/分の流速で展開し、N末端にメチオニン残基を有していないhGH画分を
- 25 プールした。プールしたhGH画分を、50mMトリス緩衝液+2.5M尿素（pH8.0）で平衡化したDEAE-5PW（5.5cmID×20cmL、東ソー（株））に吸着した後、0-100%B（B=50mM MES+2.5M尿素、pH4.0）の段階勾配で60分間、15ml/分の流速で溶出を行い、hGH約60mgを取得した。

## 実施例 26 ヒトアペリン-36 構造遺伝子の調製

図 4 に示す 6 種類の DNA 断片 (#1, #5: グライナー・ジャパン社、#2, #6: キコーテック社、#3, #4: アマシャム・ファルマシア・バイオテック) を用いて

5

### a) DNA オリゴマーのリン酸化

5' 末端になるべき #1 及び #6 を除いた 4 種類のオリゴマー各 1  $\mu$ g を 100  $\mu$ L のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、1mM ATP、10 ユニット T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で 37℃、1 時間反応させ、5' 末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し 2 倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心で DNA を沈殿させた。

15

### b) DNA フラグメントの連結

上記 a) で得られたリン酸化 DNA フラグメントと #1 及び #2 各 1  $\mu$ g を合わせ 120  $\mu$ L とした。この混合液を 80℃で 10 分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液 30  $\mu$ L に II 液 30  $\mu$ L を加え良く混合した後、I 液 60  $\mu$ L を加え、37℃、1 時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し 2 倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心で DNA を沈殿させた。

20

### c) 5' 末端のリン酸化

沈殿を TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) 10  $\mu$ L に溶解し、100  $\mu$ L のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、1mM ATP、10 ユニット T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で 37℃、1 時

25

間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、 $-70^{\circ}\text{C}$ に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させ、 $20\text{ }\mu\text{L}$ のTE緩衝液に溶解した。

5 実施例27 ヒトアペリン-36発現プラスミドの調製

pTB960-2 (EP-A-499990: 小山ら、ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー、32巻、273頁) を XbaI 及び Aval で消化し、1%アガロース電気泳動を行い約4.4KbpのDNA断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社) を用いて抽出し、 $25\text{ }\mu\text{L}$ のTE緩衝液に溶解した。このpTB960-2のXbaI, Aval断片と上記により調製したヒトアペリン-36の構造遺伝子を TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。すなわち pTB960-2のXbaI, Aval断片溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ とヒトアペリン-36の構造遺伝子溶液 $4\text{ }\mu\text{L}$ を混合し、I液 $5\text{ }\mu\text{L}$ を加え、 $16^{\circ}\text{C}$ 、30分間反応させ、ライゲーションを行った。ライゲーション液 $10\text{ }\mu\text{L}$ を用いて E. coli JM109 コンピテントセル (東洋紡) を形質転換し、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、 $37^{\circ}\text{C}$ で1日培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晚培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドpTB960-13を調製した。このヒトアペリン-36構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTB960-13を大腸菌BL21(DE3)株 (Novagen社) に形質転換を行い、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、 $37^{\circ}\text{C}$ で1日培養し、ヒトアペリン-36-CS23融合蛋白質発現株BL21(DE3)/pTB960-13を得た(図6)。この形質転換大腸菌BL21(DE3)/pTB960-13は受託番号FERM BP-6590で1998年12月2日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された。また1998年11月11日付で受託番号IF016220として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託された。

実施例28

実施例 27 で得られた形質転換細胞を、5.0 mg/L のテトラサイクリンを含む LB 培地（1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム）1 L を用いて、2 リットル容フラスコ中で 37℃、8 時間振とう培養した。得られた培養液を 19 リットルの主発酵培地（1.68% リン酸 1 水素ナトリウム、0.3% リン酸 2 水素カリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.02% 消泡剤、0.00025% 硫酸第一鉄、0.00025% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.5% カザミノ酸）を仕込んだ 50 L 容発酵槽へ移植して、30℃ で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約 500 クレット単位になった時点で、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が 12 mg/L になるように添加し、さらに 4 時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約 660 g の湿菌体を取得し、-80℃ で凍結保存した。

#### 15 実施例 29 ヒトアペリン-36 の取得

実施例 28 で得た菌体 550 g に 10 mM EDTA + 1 mM (p-75) フリニル) マンシルホルフルオリド 塩酸塩 (pH 6.0) 溶液 1500 ml を加え、超音波処理 (BRANSON SONIFIER MODEL 450) した後、遠心分離 (10000 rpm, 60 min) を行った。上澄液はプールし、沈殿は再び同様の操作を行った。プールした上澄液は pH 6.0 に調整し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した AF-Heparin Toyopearl 650M カラム (30mm ID × 500mm L, 東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、0-100% B (B = 50 mM リン酸緩衝液 + 2 M NaCl, pH 6.0) の段階勾配で溶出を行い、530 ml のヒトアペリン-36-CS23 融合タンパク質画分を得た。

この溶出液をペリコンミニカセット (ミリポア社) で 0.1 M 酢酸を加えながら濃縮を行い、ヒトアペリン-36-CS23 融合タンパク質の 0.1 M 酢酸溶液を得た。この溶液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウム塩 (DMAP-CN) 35 m

gを加えて、室温で15分間反応した。反応終了後、反応液を10%酢酸で平衡化したSephadex G-25カラム(46mmID×600mmL、ファルマシア)に通液し、平衡化に用いた10%酢酸を6ml/minの流速で展開し、S-シアノ化されたヒトアペリン-36-CS23融合タンパク質画分を得た。この溶出液をペリコンミニカセット(ミリポア社)で濃縮・脱塩を行い、ヒトアペリン-36-CS23融合タンパク質の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度6Mとなるように尿素を添加した後、さらに、0.06N濃度となるように1N苛性ソーダを加え、0℃で15分間反応した。反応終了後、酢酸でpH6.0に調整し、ヒトアペリン-36を得た。この反応液を3M尿素を含む50mMリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化したSP-5PW(21.5mmID×150mmL、東ソー)に通液し、吸着、洗浄した後、0-40%B(B=50mMリン酸緩衝液+1MNaCl+3M尿素、pH6.5)の段階勾配で溶出を行い、ヒトアペリン-36を画分を得た。このヒトアペリン-36画分を、さらに0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)で平衡化したC4P-50(21.5mmID×300mmL、昭和電工)に通液し、吸着、洗浄した後、15-30%B(B:80%アセトニトリル/0.1%TFA)の段階勾配で溶出を行い、ヒトアペリン-36画分をプールした後、凍結乾燥を行い、ヒトアペリン-36凍結乾燥粉末を得た。

#### a) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(日立L-8500A Amino Acid Analyzer)を用いて決定した。

その結果、N末端にメチオニン残基を有するヒトアペリン-36のDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した(表15)。

表15: アミノ酸組成分析

アミノ酸	1 モル当たりの 残 基 数	ヒトアペリン-36の塩基配列 から予測される値
A s x	1. 0	1
T h r 1)	0	0

	S e r 1)	1 . 9	2
	G l x	3 . 0	3
	P r o	5 . 7	6
	G l y	5 . 7	6
5	A l a	0	0
	C y s 2)	N . D .	0
	V a l	1 . 0	1
	M e t	2 . 0	1
	I l e	0	0
10	L e u	2 . 0	2
	T y r	0	0
	P h e	1 . 9	2
	H i s	1 . 0	1
	L y s	1 . 8	2
15	A r g	7 . 3	8
	T r p	0 . 9	1

酸加水分解（6 N 塩酸－4 %チオグリコール酸、110℃、24、48時間加水分解）

1) 0時間に外挿した値

20

2) 未検出

#### b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、得られたヒトアペリン-36のN末端にはメチオニンが付加していることのほかはDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した（表16）。

25

表16：N末端アミノ酸配列

検出された

ヒトアペリン-36の塩基配列

残基 No.	PTH 1) -アミノ酸 (pmol)	から予測される アミノ酸	
5	1	M e t (526)	
	2	L e u (648)	L e u
	3	V a l (513)	V a l
	4	G l n (437)	G l n
	5	P r o (463)	P r o
10	6	A r g (216)	A r g
	7	G l y (232)	G l y
	8	S e r (129)	S e r
	9	A r g (129)	A r g
	1 0	A s n (142)	A s n
15	1 1	G l y (185)	G l y
	1 2	P r o (219)	P r o
	1 3	G l y (202)	G l y
	1 4	P r o (188)	P r o
	1 5	T r p (88)	T r p
20	1 6	G l n (116)	G l n
	1 7	G l y (120)	G l y
	1 8	G l y (72)	G l y
	1 9	A r g (56)	A r g
	2 0	A r g (40)	A r g

1 nmol を用いて分析を行った。

1) フェニールチオヒダントイン

25

c) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて分析した（表17）。

表 17 : C末端アミノ酸分析

	C末端アミノ酸	回収率
ヒトアペリン-36		(%)
	P h e	38.6

5 気相ヒドラジン分解法 (100℃、6時間)

以上の結果から実施例29で得られたヒトアペリン-36は、そのN末端にメチオニン残基を有する分子種 (Me t-ヒトアペリン-36) であることがわかった。

10

#### 実施例30 (生物活性測定)

実施例29で取得したMe t-ヒトアペリン-36を用いて、特願平10-271645号の実施例6に記載の方法 (サイトセンサー) で活性を測定し、ヒトアペリン-36の合成品と同等の活性を有することを確認した。

15

#### 実施例31 (N末端のメチオニン残基の除去)

実施例29で取得したMe t-ヒトアペリン-36 4mgを3M尿素溶液0.8mlに溶解した後、80mM硫酸銅 0.05ml、グリオキシル酸 0.046g、ピリジン 0.1mlの混合液を加え、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を2.5M尿素+10mMリン酸緩衝液 (pH 5.5) で平衡化したセファデックス (S e p h a d e x) G-25カラム (10mmID × 250mmL) に通液し、平衡化に用いた溶液を0.5ml/分の流速で展開し、メチオニン残基のジケトン体を有するヒトアペリン-36画分をプールした。続いてこの画分に等量の 2Mギ酸ナトリウム、4M酢酸、3M尿素溶液を加えた後、3,4-ジアミノ安息香酸を40mM濃度になるように添加し、30℃で3日間反応した。反応終了後、反応液を50mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (25mmID × 600mmL) に通液し、平衡化に用いた緩衝液を4ml/分の流速で展開し、N末端にメチオニン残基を有していないヒトアペリン-36画分をプールした。プール

20

25



したヒトアペリン-36画分をpH6.0に調整し、50mMリン酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素(pH5.0)で平衡化したCM-5PW(7.5mmID×75mmL、東ソー(株))に吸着した後、0-100%B(B=50mMほう酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素、pH9.0)の段階勾配で40分間、0.8ml/分の流速で溶出を行い、ヒトアペリン-36画分をプールした。さらに、ヒトアペリン-36を0.1%TFAで平衡化したC4P-50(10mmID×250mmL、昭和電工(株))に吸着した後、15-30%B(B=80%アセトニトリル/0.1%TFA)の段階勾配で40分間、2ml/分の流速で溶出した。ヒトアペリン-36のフラクションをプールした後、凍結乾燥を行い、ヒトアペリン-36を取得した。

a) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(日立L-8500A Amino Acid Analyzer)を用いて決定した。

その結果、hA10LのDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した(表18)。

表18: アミノ酸組成分析

	アミノ酸	1モル当たりの	ヒトアペリン-36の塩基配列 から予測される値
		残基数	
20	Asx	1.0	1
	Thr1)	0	0
	Ser1)	1.9	2
	Glx	2.9	3
	Pro	6.3	6
25	Gly	5.9	6
	Ala	0	0
	Cys2)	N.D.	0
	Val	1.0	1
	Met	1.0	1

	I l e	0	0
	L e u	2 . 0	2
	T y r	0	0
	P h e	1 . 9	2
5	H i s	1 . 0	1
	L y s	1 . 9	2
	A r g	7 . 6	8
	T r p	0 . 9	1

10 酸加水分解（6 N 塩酸－4 %チオグリコール酸、110℃、24、48時間加水分解）

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

#### b) N末端アミノ酸配列分析

15 N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、得られたヒトアペリン－36のDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した（表19）。

20 表19：N末端アミノ酸配列

残基 No.	検出された	ヒトアペリン－36の塩基配列
	PTH 1) -アミノ酸 (pmol)	から予測される アミノ酸
	L e u (475)	L e u
25	V a l (845)	V a l
	G l n (365)	G l n
	P r o (563)	P r o
	A r g (425)	A r g
	G l y (424)	G l y

	7	S e r (139)	S e r
	8	A r g (423)	A r g
	9	A s n (245)	A s n
	1 0	G l y (290)	G l y
5	1 1	P r o (197)	P r o
	1 2	G l y (234)	G l y
	1 3	P r o (197)	P r o
	1 4	T r p (101)	T r p
	1 5	G l n ( 76)	G l n
10	1 6	G l y ( 84)	G l y
	1 7	G l y (130)	G l y
	1 8	A r g ( 79)	A r g
	1 9	A r g (116)	A r g
	2 0	L y s ( 43)	L y s

15 1 n m o l を用いて分析を行った。

1) フェニールチオヒダントイン

#### c) C末端アミノ酸分析

20 C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて分析した（表20）。

表20：C末端アミノ酸分析

	C末端アミノ酸	回収率
ヒトアペリン-36		(%)
25	P h e	86.6

気相ヒドラジン分解法（100℃、6時間）

#### 実施例32（生物活性測定）

実施例31で取得したヒトアペリン-36を用いて、特願平10-271646

号の実施例 6 に記載の方法（サイトセンサー）で活性を測定し、ヒトアペリンー 36 の合成品と同等の活性を有することを確認した。

#### 産業上の利用可能性

- 5       本発明により、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチド、蛋白質またはその塩から、該メチオニン残基のみを選択特異的かつ効率的に取り除き、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有していないペプチド、蛋白質またはその塩を効率よく生産することができる。また、本発明の方法によれば、ペプチドまたは蛋白質の種類に拘わらず、しか
- 10       もマイルドな条件下でN末端のメチオニン残基を化学的に除去することができるので、遺伝子工学的手法により製造されたメチオニン残基を有するペプチド、蛋白質またはその塩を原料にして、天然型のアミノ酸配列を有するペプチドまたは蛋白質を工業的に有利に製造することができる。

## 請求の範囲

1. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基のジケトン体の除去方法。

5
2. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩が、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を $\alpha$ -ジケトン類と反応させることにより得られるペプチドまたはその塩である請求項1記載の方法。

10
3. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドが遺伝子工学的に製造されたペプチドである請求項2記載の方法。
4. ペプチドが(i)成長ホルモン, (ii)ベータセルリン, (iii)インターロイキン-2, (iv)ニュートロフィン-3または(v)アペリンである請求項1記載の方法。

15
5. ペプチドが成長ホルモンである請求項1記載の方法。
6. 酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムが、pH約2ないし9で約0.1ないし8 mol/Lの緩衝液として用いられることを特徴とする請求項1記載の方法。

20
7. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基のジケトン体の除去方法。
8. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有していないペプチドまたはその塩の製造法。

25

9. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩が、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を $\alpha$ -ジケトン類と反応させることにより得られるペプチドまたはその塩である請求項8記載の製造法。

- 5     10. 酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムが、pH約2ないし9で約0.1ないし8mol/Lの緩衝液として用いられることを特徴とする請求項8記載の製造法。

- 10    11. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩を、酢酸およびギ酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端にメチオニン残基を有していないペプチドまたはその塩の製造法。

- 15    12. 遺伝子工学的に製造され、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するヒト成長ホルモンまたはその塩をグリオキシル酸またはその塩と硫酸銅およびピリジンの存在下に反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端にメチオニン残基を有していないヒト成長ホルモンまたはその塩の製造法。

- 20    13. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩の該メチオニン残基を除去するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii)3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用。

- 25    14. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩の該メチオニン残基のジケトン体を除去するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii)3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用。

- 15    15. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩から、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有しないペプチドまたはその塩を製造するための、(i)酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii)3,4-

ジアミノ安息香酸またはその塩の使用。

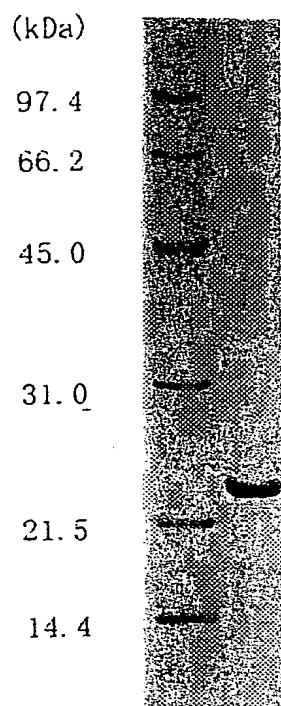
16. N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有するペプチドまたはその塩から、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基のジケトン体を有していないペプチドまたはその塩を製造するための、(i)
- 5 酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウム、と(ii) 3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩の使用。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



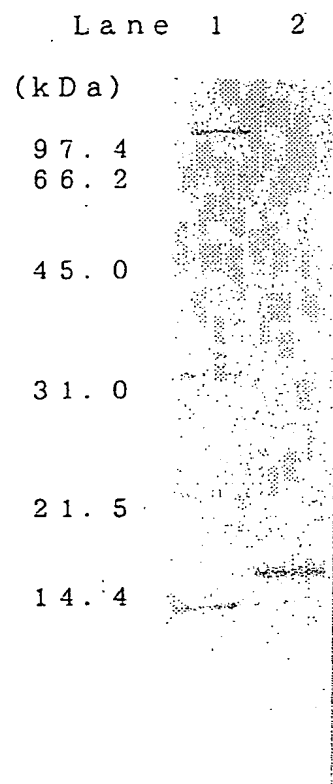
[図 1]

L a n e 1 2



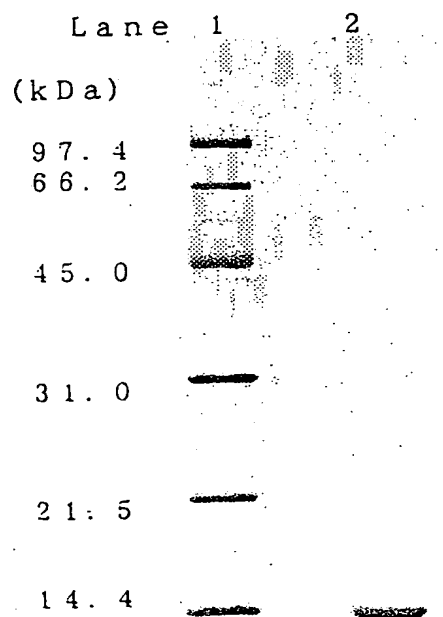
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[図 2]



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[図 3]



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

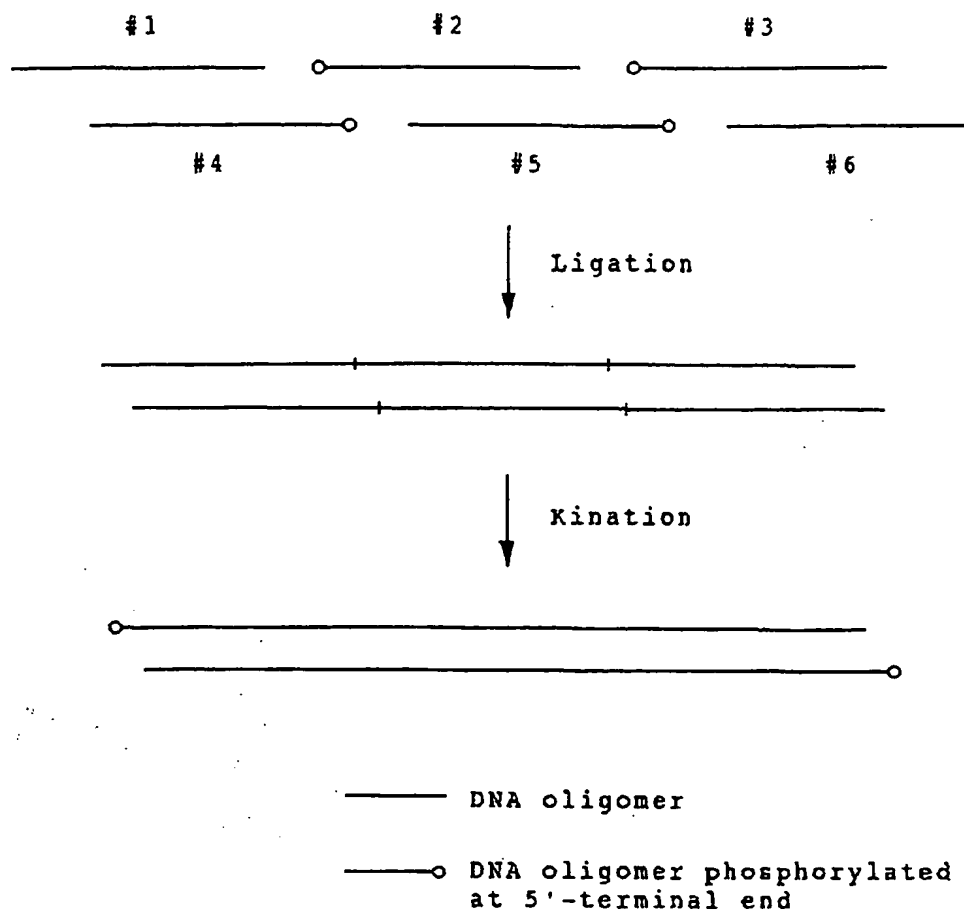
[☒ 4]

#1 5'CTAGAAAGGAGATATCATATGCTGGTTCAACCGCGTGGTTCT  
#2 5'CGTAATGGTCCGGGTCCCATGGCAAGGTGGTCGTCGTAATTTTCGTC  
#3 5'GTCAACGTCCGGCTCTGTCTCATAAAGGTCCGATGCCGTTTGGCC  
#4 5'GACCATTACGAGAACCAACGCGGTGAACCAAGCATATGATCTCCTTT  
#5 5'GGACGTTGACGACGAAATTACGACGACCACCTTGCCATGGACCCG  
#6 5'TCGGGGCAAAACGGCATCGGACCTTTATGAGACAGACGC

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

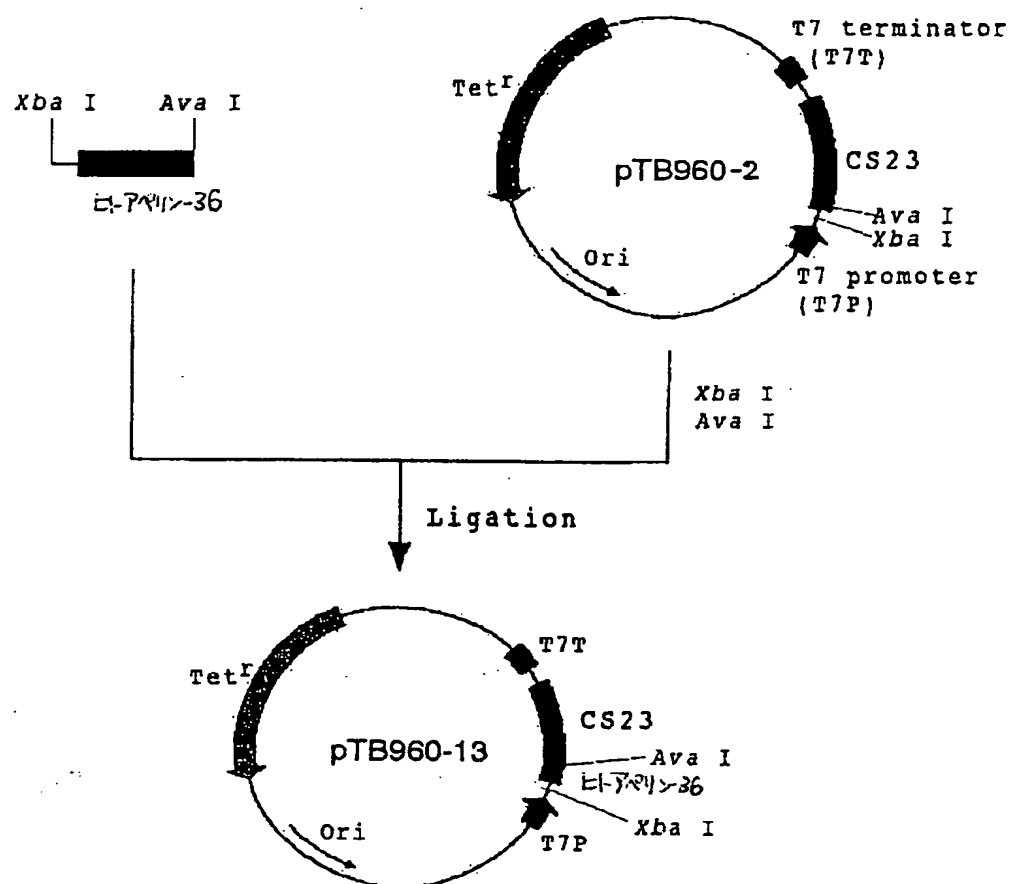


[ 5 ]



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[図 6]



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05456

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 1/12, C12N 15/09 // C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 1/12, C12N 15/09, C12P 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.), 17 December, 1997 (17.12.97) & JP, 10-072489, A & KR, 98002062, A & CA, 2207723, A & DE, 69700561, E	1-16
A	EP, 193515, A1 (MONSANTO CO.), 03 September, 1986 (03.09.86) & PT, 82070, A & AU, 8942825, A & NO, 300551, B1 & JP, 2863113, B2 & ZA, 8601323, A & DK, 8600808, A & CN, 1051302, A & ES, 8801851, A & US, 5744328, A & IE, 80663, B & RU, 2094439, C1 & CA, 1338981, C & BR, 1100005, A3 & IL, 112402, A & JP, 7309890, A & HU, 210671, B & RO, 106956, B1 & KR, 9200849, B1 & SU, 1646489, A	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2000 (17.01.00)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2000 (25.01.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05456

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 86/01229, A (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.), 27 February, 1986 (27.02.86) & ZA, 8506194, A & AU, 8547739, A & EP, 191827, B1 & JP, 96022240, B2 & IL, 76107, A & DE, 3586773, G & CA, 1318869, C	1-16

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05456

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C 07 K 1/12, C 12 N 15/09 // C 12 P 21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C 07 K 1/12, C 12 N 15/09, C 12 P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T ファイル (J O I S), W P I (D I A L O G), B I O S I S (D I A L O G)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 812856, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD.) 17. 12月. 1997 (17. 12. 97) & JP, 10-072489, A & KR, 98002062, A & CA, 2207723, A & DE, 69700561, E	1 - 1 6
A	EP, 193515, A1 (MONSANTO CO.) 3. 9月. 1986 (03. 09. 86) & PT, 82070, A & AU, 8942825, A & NO, 300551, B1 & JP, 2863113, B2 & ZA, 8601323, A & DK, 8600808, A & CN, 1051302, A & ES, 8801851, A & US, 5744328, A & IE, 80663, B & RU, 2094439, C1 & CA, 1338981, C & BR, 1100005, A3 & IL, 112402, A & JP, 7309890, A & HU, 210671, B & RO, 106956, B1 & KR, 9200849, B1 & SU, 1646489, A	1 - 1 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 01. 00

国際調査報告の発送日

25.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 86/01229, A (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.) 27. 2月. 1986 (27. 02. 86) & ZA, 8506194, A & AU, 8547739, A & EP, 191827, B1 & JP, 96022240, B2 & IL, 76107, A & DE, 3586773, G & CA, 1318869, C	1 - 16